



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

FASCIIOLOSE BOVINA:
ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLOGICOS NO ALENTEJO

Ana Margarida Caetano Bandeira da Costa

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho
Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima
Doutor George Thomas Stilwel
Dr. João Eduardo Correia Tomé

ORIENTADOR

Dr. João Eduardo Correia Tomé

CO-ORIENTADOR

Doutor Miguel Luís Mendes
Saraiva Lima

2010
LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

FASCIIOLOSE BOVINA:
ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLOGICOS NO ALENTEJO

Ana Margarida Caetano Bandeira da Costa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho
Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima
Doutor George Thomas Stilwel
Dr. João Eduardo Correia Tomé

ORIENTADOR

Dr. João Eduardo Tomé

CO-ORIENTADOR

Doutor Miguel Luís Mendes
Saraiva Lima

2010
LISBOA

Dedicatória aos Amigos...

Um dia a maioria de nós irá separar-se.
Sentiremos saudades de todas as conversas jogadas fora, das descobertas que fizemos, dos sonhos que tivemos, dos tantos risos e momentos que partilhamos. Saudades até dos momentos de lágrimas, da angústia, das vésperas dos finais de semana, dos finais de ano, enfim... do companheirismo vivido.
Sempre pensei que as amizades continuassem para sempre.
Hoje não tenho mais tanta certeza disso.
Em breve cada um vai para seu lado, seja pelo destino ou por algum desentendimento, segue a sua vida.
Talvez continuemos a nos encontrar, quem sabe... nas cartas que trocaremos. Podemos falar ao telefone e dizer algumas tolices... Até que os dias vão passar, meses...anos... até este contacto se tornar cada vez mais raro.
Vamo-nos perder no tempo.... Um dia os nossos filhos vão ver as nossas fotografias e perguntarão: "Quem são aquelas pessoas?" Diremos...que eram nossos amigos e.....
isso vai doer tanto! "
Foram meus amigos, foi com eles que vivi tantos bons anos da minha vida!" A saudade vai apertar bem dentro do peito.
Vai dar vontade de ligar, ouvir aquelas vozes novamente..... Quando o nosso grupo estiver incompleto... reunir-nos-emos para um último adeus de um amigo.
E, entre lágrimas abraçar-nos-emos. Então faremos promessas de nos encontrar mais vezes desde aquele dia em diante.
Por fim, cada um vai para o seu lado para continuar a viver a sua vida, isolada do passado.
E perder-nos-emos no tempo..... Por isso, fica aqui um pedido deste humilde amigo: não deixes que a vida te passe em branco, e que pequenas adversidades sejam a causa de grandes tempestades... Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!"

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Ao Dr. Tomé por ter aceite orientar o meu estágio curricular, pela paciência e por me ter transmitido os seus conhecimentos.

Ao Prof. Miguel Saraiva Lima, meu co-orientador, pela disponibilidade e dedicação sempre mostradas.

Ao Prof. Luís Carvalho pelos conselhos e por toda a ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Rui Silva por tudo o que ensinou, por me abrir os horizontes e por me ter enriquecido tanto a nível profissional, como pessoal.

Ao Vasco por me ter aberto a porta de sua casa e mostrar outra realidade profissional.

À Lídia pelo que me ensinou e pela ajuda durante a parte laboratorial do trabalho.

Ao Bernardo que contribuiu para o enriquecimento do meu estágio e à amizade do Luís que com a sua boa disposição torna a vida de campo ainda mais apelativa.

Agradeço à minha família o apoio incondicional que sempre me deu quer a nível académico, quer a nível pessoal.

Ao Carlos Eduardo pela compreensão, incentivo, apoio, amizade e tudo o que me proporcionou desde que o conheço.

À minha sócia por estar sempre presente, pelos conselhos, pelo incentivo e pela pessoa incomparável que é para mim.

À Ana Maria pelo companheirismo e amizade desde que entrei para a FMV.

A todos os meus amigos, em particular ao João Luís, João Veiga, Ritinha, Madalena, Carolina, Alex e Xana.

Resumo

Fasciolose Bovina: Aspectos clínicos e epidemiológicos no Alentejo

A “grande dúvia do fígado”, *Fasciola hepatica*, é um parasita cujo principal hospedeiro intermediário é o molusco *Lymnaea truncatula* e que pode ter como hospedeiro definitivo várias espécies como ruminantes domésticos e silváticos, roedores, suínos, equinos e o Homem. Nos bovinos, a fasciolose é geralmente subclínica, no entanto pode provocar graves perdas económicas. É então necessário que os médicos veterinários tenham à sua disposição meios de diagnóstico fiáveis para que possam intervir precocemente no seu controlo.

Este trabalho é constituído por uma parte teórica na qual são desenvolvidos alguns aspectos importantes da doença, nomeadamente epidemiológicos, clínicos e profiláticos e por uma parte prática que consistiu na recolha de fezes, de um total de 8 efectivos de bovinos no Alentejo, para pesquisa de ovos de *F. hepatica*, através de um método de sedimentação natural. O objectivo inicial era avaliar o impacto da infecção por *F. hepatica* no diagnóstico da tuberculose, o que não foi possível concretizar, uma vez que todas as amostras processadas apresentaram resultados negativos. Assim não foi possível provar que os animais tinham fasciolose, embora muitos deles apresentassem sinais clínicos da doença, estando realmente infectados, o que foi provado mais tarde com uma prova serológica. Deste modo foi possível concluir que o teste coprológico pode apresentar algumas limitações como meio de diagnóstico de fasciolose bovina e que a prevalência desta parasitose pode ser mais importante do que inicialmente se suspeitava.

Palavras-chave: fasciolose bovina, *Fasciola hepatica*, epidemiologia, diagnóstico, coprologia.

Abstract

Bovine fasciolosis: Clinical and epidemiological aspects in Alentejo

The common liver fluke, *Fasciola hepatica*, it's a parasite whose primary intermediate host is the aquatic snail *Lymnaea truncatula* and may have several species as definitive hosts like domestic and wild ruminants, rodents, pigs, horses and humans. In cattle, fasciolosis is usually subclinical but can cause serious economic losses. It is therefore necessary that the veterinarians have available reliable diagnostic tools so that they can intervene prematurely in its control. This work consists of a theoretical part in which it is presented some important aspects of the disease, including epidemiological, clinical and prophylactic and a practical part consisting of the collection of feces, in a total of eight herds of cattle in the Alentejo, to search for eggs of *F. hepatica*, by a natural sedimentation method. The initial aim was to assess the impact of infection by *F. hepatica* in the diagnosis of tuberculosis, which was not possible to achieve, since all processed samples tested negative. So it was not possible to prove that the animals had fasciolosis, although many of them presented clinical signs of illness, and were actually infected, as proven later by a serological test. Thus it was concluded that the coprological test may present some limitations as a mean of diagnosis of bovine fasciolosis and that the prevalence of fasciolosis may be more important than initially suspected.

Key words: Bovine fasciolosis, *Fasciola hepatica*, epidemiology, diagnosis, coprology.

Índice Geral

CAPÍTULO I.....	1
1.1 Breve descrição das actividades realizadas durante o estágio	1
CAPÍTULO II – Parte teórica.....	4
2.1 Introdução	4
2.2 História.....	6
2.3 Taxonomia	6
2.4 Morfologia	7
2.4.1 Tegumento.....	7
2.4.2 Sistema digestivo.....	8
2.4.3 Sistema excretor	8
2.4.4 Sistema reprodutor	8
2.4.5 Formação do ovo	9
2.4.6 Sistema nervoso	9
2.5 Ciclo de Vida	10
2.5.1 Fase extramamífero	11
2.5.2 Fase intramamífero	14
2.6 Algumas características	15
2.7 Mecanismos de Patogenicidade.....	16
2.8 Hospedeiro Intermediário	17
2.8.1 Classificação.....	17
2.8.2 Características gerais	17
2.8.3 Morfologia de <i>L. truncatula</i>	18
2.8.4 Ciclo de vida	18
2.8.5 Biótipo/Ecologia	19
2.8.6 Factores que afectam o desenvolvimento do molusco.....	20
2.8.7 Susceptibilidade/Resistência	21
2.9 Hospedeiro definitivo.....	21
2.10 Fasciolose Bovina	22
2.10.1 Epidemiologia	22
2.10.2 Fisiopatologia.....	24
2.10.3 Sinais Clínicos	35
2.10.4 Lesões	37
2.10.5 Relação Hospedeiro/Parasita.....	41
2.10.6 Diagnóstico clínico	42
2.10.7 Diagnóstico laboratorial.....	44

2.10.8 Achados de necrópsia.....	45
2.10.9 Diagnóstico coprológico	47
2.10.10 Diagnóstico Serológico	50
2.10.11 Tratamento	53
2.10.12 Resistência aos anti-helmínticos	58
2.10.13 Prevenção/Controlo	59
2.10.14 Vacinação	64
2.10.15 Importância	65
2.10.16 Situação em Portugal.....	67
CAPÍTULO III - Parte prática.....	69
3.1 Estudo A:.....	69
3.2 Estudo B:.....	69
3.3 Materiais e Métodos	69
3.4 Resultados	70
3.5 Discussão e Conclusão	71
3.6 Casos Clínicos	71
Anexo 1	89
Anexo 2	90
Anexo 3	91

Índice de quadros

Quadro 1 – Fasciolicidas (Adaptado de Apifarma, 2007)	54
Quadro 2 - Resultados do exame coprológico	70

Índice de figuras

Figura 1 - Parasita Adulto	7
Figura 2 – Morfologia do aparelho reprodutivo	9
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>F. hepatica</i>	10
Figura 4- Ovo de <i>F. hepatica</i>	11
Figura 5- Eclosão do miracídio	12
Figura 6 - Rédia	13
Figura 7 - Metacercária.....	14
Figura 8 - Parasita adulto.....	15
Figura 9 - <i>Lymnaea truncatula</i>	18
Figura 10 - Habitat dos moluscos.....	19
Figura 11 - Hiperplasia dos ductos biliares	27
Figura 12 -- Pêlo baço e seco, edema submandibular, emaciação, prostração.....	36
Figura 13 - Diarreia, fezes mucoides, esteatorreicas	36
Figura 14 - Colangite e calcificação, estase biliar, inflamação e formação de abscesso	37
Figura 15 - Fibrose hepática e colangite	39
Figura 16 - Jovem parasita em migração no parênquima hepático: infiltração celular, hemorragia e células hepáticas em necrose junto ao parasita	41
Figura 17 - Colangite e perihepatite fibrosa	41
Figura 18 - Mucosas ictéricas Figura 19 - Fezes mucoides.....	43
Figura 20 - Hiperplasia e calcificação dos ductos biliares	46
Figura 21 - Aumento dos linfonodos hepáticos	47
Figura 22 - Ovo de <i>F. hepatica</i>	50
Figura 23 - Ovo de <i>Paramphistomum</i> spp.....	50

Lista de abreviaturas

µL – Microlitro

µm – Micrómetro

Ac – Anticorpo

AST – Aspartato aminotransferase

ATP – Adenosina trifosfato

BVD – Bovine virus diarrhea

cm – Centímetro

CO₂ – Dióxido de carbono

DIV – Divisão de intervenção veterinária

dL – Decilitro

ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay

ES – Excreção-secreção

F. hepatica – *Fasciola hepatica*

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

g - grama

GGT – Gama glutamil transpeptidase

GLDH – Glutamato desidrogenase

I.S. – Intervalo de segurança

IBR – Infectious bovine rhinotracheitis

IFNγ – Interferão gama

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

Kg – Quilograma

L – Litro

L. truncatula – *Lymnaea truncatula*

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

MMA – Metrite-mastite-agaláxia

°C – Graus Célsius

OPG – Ovos por grama de fezes

Pos – Positivo

Racio A/G – Quociente albumina/globulina

rpm – Rotações por minuto

SDH – Sorbitol desidrogenase

UI – Unidade Internacional

CAPÍTULO I

1.1 Breve descrição das actividades realizadas durante o estágio

O meu estágio curricular foi realizado em Ponte de Sôr, distrito de Portalegre, onde acompanhei o Médico Veterinário da zona, Dr. João Eduardo Tomé, que presta assistência a várias explorações pertencentes aos concelhos de Ponte de Sôr, Avis, Mora, entre outros. Na espécie bovina, a maioria dos efectivos aos quais são prestados serviços, são de raça cruzada, havendo alguns de raças Alentejana e Mertolenga e uma minoria das raças Preta e Mirandesa. Quanto aos pequenos ruminantes a maioria correspondem a ovinos de aptidão carne e alguns caprinos de aptidão carne/leite. Tanto os bovinos, como os ovinos e os caprinos referidos são explorados em regime extensivo ou semi-extensivo.

Durante 4 meses (de Setembro a Janeiro) a actividade principal foi a realização da Sanidade dos efectivos acima mencionados, com respectiva vacinação, desparasitação interna e por vezes externa, recolha de sangue para o rastreio de brucelose e tuberculinização. Além da sanidade foram realizadas algumas acções dentro da área da Clínica e da Medicina Interna, como por exemplo o tratamento de ovinos infectados com o vírus da língua azul, que se revelou um grande problema na zona e tratamento de vacas com fasciolose. Ainda, ao longo destes meses foi realizado um ensaio em colaboração com a Bayer, em borregos e cabritos para avaliar o impacto económico da administração do coccidiostático Baycox® (Toltrazuril).

Tive também a oportunidade de acompanhar outro Médico Veterinário que trabalha na área dos Bovinos de raça Brava de Lide, o Dr. Vasco Brito Paes. Aqui a actividade predominante foi o manejo reprodutivo dos efectivos, que inclui acções como o controlo do manejo alimentar de vários lotes de animais dentro de uma vacada, diagnóstico de gestação por palpação rectal e ultrasonografia, rastreio, prevenção e tratamento de patologias que possam contribuir para a diminuição da fertilidade e exame andrológico aos touros. Ainda dentro desta área tive oportunidade de presenciar alguns casos clínicos dentro da patologia podal (laminite), da patologia oftálmica (conjuntivite), drenagem de abscessos e alguns casos de resolução cirúrgica como remoção de abscessos com posterior reconstrução da zona e amputação de dígitos. Fora da área dos bovinos de raça Brava, o manejo reprodutivo foi também realizado em bovinos de carne, foi realizada sanidade em efectivos de suínos e alguma clínica de equinos, nomeadamente em patologia digestiva (cólicas) e patologia podal (laminite).

Por último acompanhei o Dr. Rui Silva, que trabalha ao longo do litoral alentejano e Algarve. Durante este tempo além de alguma sanidade realizada em bovinos e ovinos,

do manejo reprodutivo efectuado em bovinos de carne e de leite e de algumas descornas efectuadas nos mesmos, a maior parte do trabalho foi feita na área da clínica, cuja casuística vou sistematizar de acordo com a espécie, sendo que a espécie mais prevalente foi a bovina.

Bovinos Leiteiros – Entre estes os casos mais frequentes foram de origem metabólica, como hipocalcémia, hipomagnesiémia, cetose, fígado gordo, acidose ruminal e patologia gastrointestinal nomeadamente indigestão simples, indigestão vagal, diarreias, timpanismo e menos frequentemente peritonite. Também com alguma frequência foram tratados casos de metrite, endometrite, mamite e casos de patologia podal sendo os mais comuns a dermatite digital, dermatite interdigital, tiloma e úlceras. Problemas respiratórios como pneumonias tiveram alguma incidência, bem como lesões nervosas comuns no pós-parto (paralisia do obturador). Quanto aos vitelos foram diagnosticadas com elevada frequência diarreias neonatais. A clínica cirúrgica consistiu maioritariamente em resolução de deslocamentos do abomaso à esquerda e alguns casos de remoção da 3ª pálpebra devido a carcinoma das células escamosas, laparotomia exploratória e remoção de pólipos do canal do teto.

Bovinos de carne – Grande parte das consultas efectuadas e com elevada prevalência foram na área da reprodução e obstetrícia. Os partos assistidos foram devido a distócias de origens variadas (apresentação, atitude, posição, desproporção, torção uterina e um *Shistosoma reflexus*) e representaram a urgência mais comum nesta actividade, seguidos de prolapso uterino, prolapso vaginal, retenção placentária, metrites e endometrites. Também bastante frequentes foram as chamadas para tratamento de diarreias neonatais e diarreias em vitelos jovens. Ainda na assistência prestada a vitelos foram diagnosticadas com muita frequência pneumonias, onfalites e artrites sépticas e alguns casos de fotossensibilidade, BVD e IBR. Em animais adultos também foram diagnosticadas com alguma frequência pneumonias, intoxicações, mamites, paralisia do obturador e alguns casos de clostridiose, suspeita de listeriose e laminites. Realizou-se o aparo correctivo de cascos, por vezes com aplicação de tacos em alguns animais com patologia podal e vacinação para surtos de leptospirose que ocorreram em várias explorações. Dentro das doenças parasitárias a que teve maior expressão foi sem dúvida a fasciolose, diagnosticada em vários animais pertencentes a várias explorações. Quanto a problemas no âmbito da alimentação, foi feito o acompanhamento numa exploração de engorda com elevada prevalência de poliencefalomalacia e patologia respiratória. Em machos os problemas mais encontrados foram a nível musculoesquelético e relacionados com a reprodução (orquite, hematoma peniano). As intervenções cirúrgicas mais frequentes foram as cesareanas e dois casos de uterorrafia via vaginal. Por fim, especial atenção merece

um caso nunca antes diagnosticado em Portugal a que se chama síndrome hemorrágica do vitelo.

Pequenos Ruminantes – Realizou-se o seguimento a um rebanho de ovinos com dicroceliose refractaria ao tratamento e com infecções bacterianas concomitantes. Alguns casos de septicémia foram diagnosticados em cabras.

Equínos – Além da sanidade efectuada a alguns animais, os casos mais frequentes foram cólicas, subnutrição e problemas musculoesqueléticos (tendinites) também diagnosticados em burros.

Suínos – Os serviços prestados nesta espécie foram a realização de sanidade, assistência a partos, tratamento de afecções como mal-rubro, MMA e colibacilose em leitões.

CAPÍTULO II – Parte teórica

2.1 Introdução

A Fasciolose é causada pelo trematode *Fasciola hepatica* e afecta muitas espécies de animais domésticos e selvagens por todo o mundo, principalmente em regiões temperadas, onde as condições climáticas são adequadas para os moluscos aquáticos da espécie *Lymnaea truncatula* que servem como hospedeiro intermediário para o parasita. A Fasciolose inicia-se quando o parasita é ingerido sob a forma de metacercárias presentes na pastagem contaminada. No intestino os jovens parasitas perfuram a parede intestinal e atravessam a cavidade peritoneal em direcção ao fígado. No fígado os parasitas adultos vivem, alimentam-se e reproduzem-se nos ductos biliares (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). Em bovinos as consequências da doença dão origem a prejuízos económicos não só pela rejeição de fígados em matadouro, mas também por redução da produção e da qualidade do leite, do ganho de peso, atraso no crescimento diminuição da fertilidade e custos no tratamento da doença ou das infecções secundárias que surgem frequentemente (Cunha *et al*, 2007). *F. hepatica* coloniza os fígados dos animais apesar do desenvolvimento de uma resposta imunitária humoral e celular (Jacquiet, 2008). Os achados clínicos mais frequentes incluem diarreia persistente e perda de peso crónica com uma diminuição da condição corporal. A infecção pode ser detectada patologicamente através da observação dos trajectos migratórios à superfície do fígado que correspondem a tecido de cicatrização fibroso (Zimmerman, 1996). A infiltração celular no fígado é composta essencialmente por eosinófilos, macrófagos e linfócitos (Tanimoto *et al*, 1998). O diagnóstico de fasciolose durante as fases precoces da doença pode ser baseado em dados epidemiológicos (anos de elevado risco devido às condições climáticas), aumento das enzimas hepáticas e testes serológicos. As formas crónicas também podem ser diagnosticadas pela demonstração de ovos do parasita em amostras fecais, apesar de que estes possam ser escassos e difíceis de encontrar (Dorchies, 2006). Actualmente a utilização de fasciolicidas é o método de controlo mais utilizado, sendo o Triclabendazol o princípio activo cuja acção abrange as formas imaturas e as adultas dos parasitas. As más práticas de utilização destes fármacos podem resultar no desenvolvimento de resistências (Sangster, 2001) e como tal torna-se necessário implementar algumas regras de utilização bem como desenvolver outros métodos de controlo, como as vacinas (Fairweather & Boray, 1999). A vedação dos habitats dos caracóis raramente é praticável e na maioria das situações torna-se dispendiosa, acontecendo o mesmo com a drenagem (Armour, 1975).

Este trabalho tem como objectivo apresentar uma revisão bibliográfica que aborda os aspectos etiológicos, epidemiológicos, fisiopatológicos, clínicos e profilácticos da doença em bovinos.

Quanto à parte experimental, o objectivo inicial era o estudo do efeito da infecção por *Fasciola hepatica* no diagnóstico de tuberculose em bovinos, mas por razões técnicas não foi possível concluir o estudo. No entanto permitiu retirar algumas conclusões sobre a sensibilidade do método coprológico como diagnóstico de fasciolose bovina.

2.2 História

Em meados do século XVI era comum pensar-se que a doença era consequência da ingestão de algumas plantas por parte das ovelhas (Andrews, 1999), inclusive por J. de Brie que ao ver o parasita num fígado de ovino associou a sua presença à ingestão de um ranúnculo, de onde surgiu o nome de “dúvia do fígado” (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). *Fasciola hepatica* parece ter sido o primeiro trematode a ser reconhecido e a primeira descrição bibliográfica da doença é feita em 1200 no livro “Black Book of Chirk”. Em 1698 Bidloo observou vermes dentro dos ductos biliares de ovelhas, veados e vitelos e ovos dentro dos parasitas enquanto que Otto Müller em 1773 observou formas com cauda a nadar em poças de água e denominou-as de cercárias. Em 1807 Nitzsch verificou as formas enquistadas das cercárias (Andrews, 1999) e em 1837 De Filippi, para homenagear Redi, denominou um estágio que tinha visto a emergir do caracol como rédias, as quais também já tinham sido observadas por Schwammerdan em 1738 e Bojanus em 1818 (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). A próxima contribuição significativa foi feita por Mehlis em 1831 que observou a saída do miracídio através do opérculo dos ovos dos tremátodes, o que foi verificado seis anos mais tarde por Creplin na *Fasciola hepatica* (Andrews, 1999; Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). Von Siebold, em 1835, relacionou vários estádios e observou o enquistamento em caracóis, mais tarde em 1842 Steenstrup tenta explicar a relação entre os estádios larvares com o parasita adulto. Em 1875 Weinland relaciona a *Fasciola hepatica* com os estádios larvares que encontra no *Lymnaea truncatula* (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999) e ainda põe a hipótese das ovelhas se infectarem por ingestão de cercárias enquistadas na erva (Andrews, 1999). Thomas e Leuckart, em estudos independentes, mostraram o ciclo de vida completo vinte anos mais tarde, mas não conseguiram demonstrar a infecção por ingestão das metacercárias, o que foi alcançado por Lutz em 1892-1893. As migrações intraorgânicas foram descritas em 1914 por Sinitzin (Bowman, 2003) e em 1952 Neidstein publica a sua obra “Chemical Physiology of Endoparasitic Animals”, na qual relata os seus estudos sobre a fisiologia e a bioquímica da *Fasciola hepatica* (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999)

2.3 Taxonomia

Reino: Animalia

Subreino: Metazoa

Phylum: Platyelmintha

Classe: Trematoda

Subclasse: Digenea

Ordem: Echinostomatida
Família: Fasciolidae
Gênero: *Fasciola*
Espécie: *Fasciola hepatica*

F. hepatica pertence ao Filo Platyelminthes caracterizados pela forma achatada dorsoventralmente, à Classe Trematoda por serem não segmentados, acelomados, hermafroditas e heteroxenos (Silva Leitão, 1983), à subclasse Digenea por necessitarem de um hospedeiro intermediário para completar o ciclo de vida e parasitarem mamíferos (Hendrix, 1998).

2.4 Morfologia

Fasciola hepatica é um helminte de corpo largo e achatado dorsoventralmente, mede entre 18-51 x 4-13 mm (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). Tem forma de folha, cor cinzenta acastanhada, possui uma projecção na extremidade anterior em forma de cone, seguida por um par de ombros cujos bordos convergem caudalmente (figura 1) (Hendrix, 1998; Kassai, 1999). Tem uma ventosa oral situada na extremidade anterior e uma ventosa ventral ou acetábulo localizada no terço anterior do parasita onde apresentam duas gêneses, sexuada (hospedeiro definitivo) e assexuada (hospedeiro intermediário) (Bowman, 2003).



Figura 1 - Parasita Adulto - (adaptado de <http://www.netvestibulando.hpg.ig.com.br/zoo16.jpg>)

2.4.1 Tegumento

Sob a superfície corporal está uma camada acelular, espessa denominada de tegumento. Trata-se de uma membrana de organização sincicial cuja superfície externa, o glicocálice, está coberta de espinhas dirigidas para trás. A camada interna do tegumento é formada por células nucleadas que se projectam para o interior do parênquima e entre as duas camadas existem pontes citoplasmáticas e uma membrana basal (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). Imediatamente abaixo

do tegumento está uma camada de fibras musculares lisas com orientação longitudinal e circular (Bowman, 2003). O tegumento está associado a acções como a absorção de nutrientes, protecção contra o sistema imunitário do hospedeiro, lise e digestão extracorporal de células do hospedeiro e mecanismos de fixação (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

2.4.2 Sistema digestivo

O aparelho digestivo é constituído pela boca, rodeada pela ventosa oral, que comunica com uma faringe bastante musculada. Esta contacta com o esófago que se bifurca em duas porções intestinais e terminam em fundo saco. Os cegos são longos, estendem-se ao longo dos bordos laterais até à extremidade posterior, têm divertículos bastante ramificados e possuem células de revestimento com funções de absorção e excreção (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). A alimentação consiste em sangue, detritos celulares, muco, bactérias (Lee, Zimmerman & Duimstra, 1992).

2.4.3 Sistema excretor

O sistema excretor tem simetria bilateral e é do tipo protonefrítico. É constituído por células ciliadas, túbulos colectores, ductos excretores e uma vesícula excretora que abre para o exterior através do nefridioporo. Este sistema está envolvido em processos de excreção e osmorregulação (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

2.4.4 Sistema reprodutor

O sistema reprodutor é constituído pelo aparelho masculino e feminino uma vez que *F. hepatica* é hermafrodita. O aparelho masculino possui dois testículos ramificados que ocupam a porção central do corpo, destes saem vasos eferentes que se unem na zona anterior e formam o vaso deferente que alarga para formar a vesícula seminal no interior da bolsa do cirro. No interior da bolsa do cirro estão ainda as glândulas prostáticas e o cirro (pénis) bem desenvolvido. O aparelho feminino é constituído por um ovário ramificado, localizado à direita e anteriormente aos testículos, do qual sai o oviducto que termina numa câmara denominada de oótipo. O oótipo encontra-se rodeado de glândulas serosas e mucosas que são as glândulas de Mehlis e recebe através do ducto vitelino, substâncias segregadas pelas glândulas vitelinas, localizadas nas margens laterais do parasita. O útero também sai do oótipo e é um tubo longo com circunvoluções, que se localiza anteriormente aos testículos e desemboca no átrio genital, assim como o cirro. O átrio genital comunica com o

exterior através do poro genital (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999), adjacente à ventosa ventral (figura 2) (Kassai, 1999).

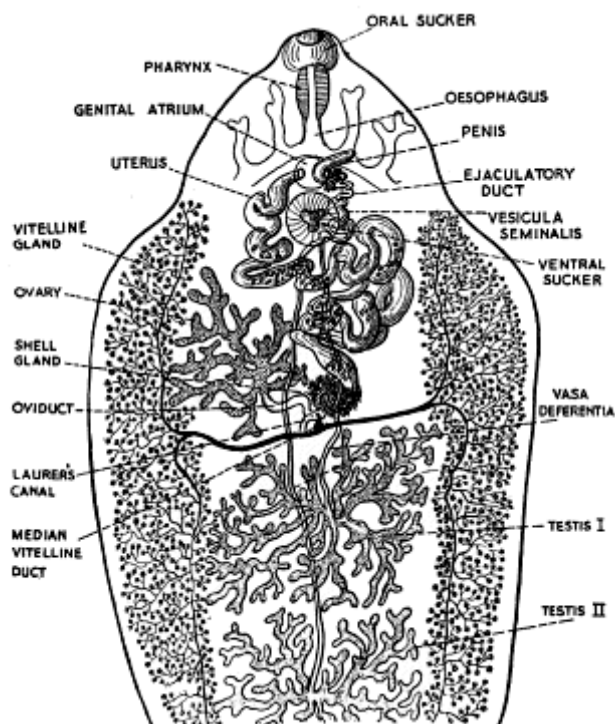


Figura 2 – Morfologia do aparelho reprodutivo (adaptado de <http://www.micrographia.com/specbiol/helminth/platyhel/trem0100/fa112gan.gif>)

2.4.5 Formação do ovo

Para formação do ovo pode ocorrer fertilização cruzada ou autofertilização (Urquhart, Armour, Duncan & Jennings, 1996). Os óvulos chegam ao oótipo e aqui são fecundados pelos espermatozoides que são introduzidos no átrio genital através do cirro e encaminhados pelo útero até ao oótipo (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). É no oótipo que o ovo adquire um vitelo, pela secreção das glândulas vitelinas e uma casca. À medida que o ovo passa pelo útero a casca vai-se tornando mais rígida e resistente, sendo depois libertado pelo poro genital (Urquhart *et al*, 1996). Os ovos são grandes, cerca de 130-150 µm por 60-90 µm, têm forma elíptica, cápsula fina, conteúdo granular de coloração castanha amarelada e são operculados num dos pólos (Thienpont, Rochette & Vanparijs, 1986).

2.4.6 Sistema nervoso

O sistema nervoso é na realidade um sistema neuroendócrino constituído por gânglios cerebrais situados em ambos os lados da faringe, uma série de plexos nervosos que enervam os vários órgãos, neurónios e células endócrinas que produzem e libertam

vários mediadores neuronais e hormonais (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

2.5 Ciclo de Vida

O ciclo de vida de *F. hepatica* (figura 3) consiste em 5 etapas:

- passagem dos ovos do hospedeiro para o ambiente exterior e seu desenvolvimento;
- eclosão do miracídio, procura e penetração no caracol hospedeiro intermediário, *Lymnaea truncatula*;
- desenvolvimento e multiplicação dos parasitas no interior do caracol;
- emergência das cercárias a partir do caracol e formação do quisto;
- ingestão das metacercárias infectantes pelo hospedeiro definitivo e desenvolvimento do parasita até à fase adulta.

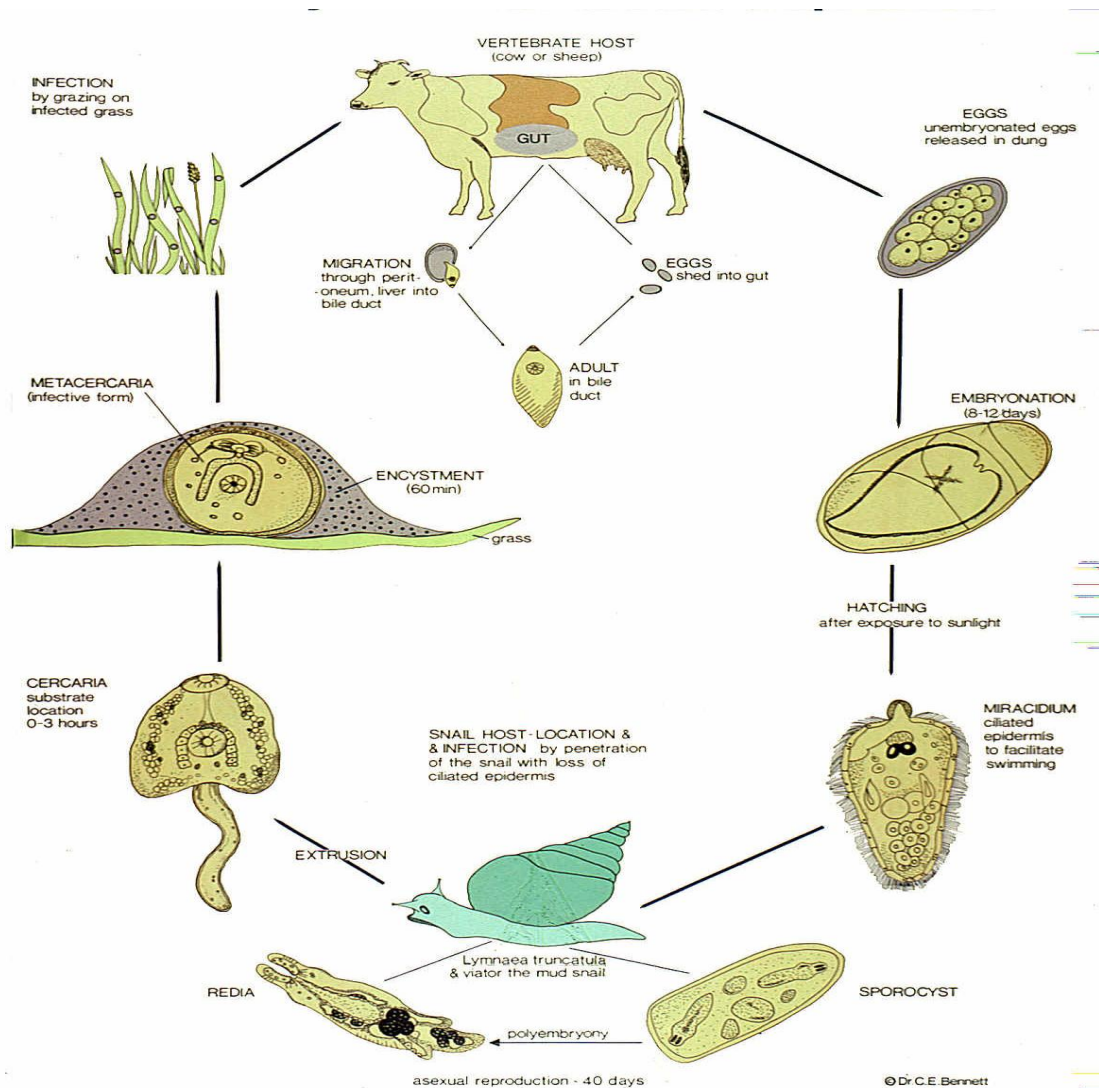


Figura 3 - Ciclo de vida de *F. hepatica* (adaptado de http://www.soton.ac.uk/~ceb/photos/fasciola/CEB_posterscan.jpg)

2.5.1 Fase intramamífero

Fasciola hepatica tem um ciclo de vida complexo, necessita de passar por um hospedeiro intermediário, sendo o mais comum um molusco da espécie *Lymnaea truncatula*. Estão envolvidos vários estádios larvares como o miracídio, esporocisto, rédia, cercária e metacercária até atingir a forma adulta que produz ovos. Este ciclo complexo só pode ocorrer se houver condições favoráveis de temperatura e humidade. Estas determinam a sobrevivência bem como a duração dos estádios de desenvolvimento do parasita tanto no meio externo como no hospedeiro intermediário.

2.5.1.1 Ovo

Quando os ovos são expulsos, juntamente com as fezes, não são segmentados nem embrionados (figura 4) (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). O ovo de *Fasciola hepatica* só se desenvolve em condições edafoclimáticas adequadas, principalmente temperatura, humidade e oxigénio. Temperaturas entre os 10°C a 30°C são necessárias para que se dê o desenvolvimento embrionário. Os ovos não resistem a altas temperaturas ou à dessecação, mas podem permanecer a temperaturas de 4°C por 2 ou mais anos (Jacquiet, 2008). A temperaturas de -5°C e -15°C os ovos morrem em cerca de 17 dias e 24 horas, respectivamente. O pH ideal para o desenvolvimento do ovo é 7, mas variações entre 4,2 a 9,0 são toleradas. É necessário um ambiente aeróbico, o que requer a separação do ovo da massa fecal (Ollerenshaw, 1971) e a sua cobertura por uma película de água. Se estas condições se verificarem, dentro do ovo, desenvolve-se uma larva móvel devido aos seus cílios denominada de miracídio (Andrews, 1999).



Figura 4- Ovo de *F. hepatica* (adaptado de http://www.rvc.ac.uk/review/parasitology/images/largeLabelled/Fasciola-hepatica-egg_-p-5.jpg)

2.5.1.2 Eclosão do ovo - Miracídio

A eclosão é estimulada pela luz e ocorre quando o miracídio provoca alteração da permeabilidade da membrana (Hussein, Hassan & Khalifa, 2010), fragilizando a união

do opérculo com a casca do ovo. A actividade do miracídio juntamente com a hipertonidade do meio interno faz expulsar a larva através da abertura do opérculo (figura 5). Também está descrito que há secreção interna de uma enzima proteolítica por parte do miracídio, que dissolve o material que mantém fixo o opérculo (Andrews, 1999). A 26°C e em meio húmido este processo completa-se em 12-15 dias (Hussein *et al*, 2010), no entanto em condições naturais com temperaturas entre 10-12°C são necessárias várias semanas (até 2 meses) (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). O miracídio mede entre 220-500 µm por 70-80 µm, é ciliado e tem uma duração de vida entre 8 a 10 horas (Hussein *et al*, 2010), que depende da temperatura ambiente e da energia disponível. Assim tem de nadar até encontrar um hospedeiro intermediário para se fixar e este comportamento está associado a fototropismo e quimiotaxia positivos (Ollerenshaw, 1959), devido a substâncias atractivas presentes no muco do caracol. Factores como a temperatura, pH, oxigénio dissolvido, composição iónica, salinidade e turvação da água também vão influenciar este mecanismo (Andrews, 1999).



Figura 5- Eclosão do miracídio
(http://sites.google.com/site/dampezeskyl/_/rsrc/1224681044852/config/app/images/Fasciola%20hepatica%20emerging%20miracidium.jpg)

2.5.1.3 De miracídio a esporocisto

Uma vez estabelecido o contacto com o hospedeiro intermediário, o processo de penetração inicia-se com a combinação de acções mecânicas e proteolíticas, através da papila móvel localizada no extremo anterior do miracídio e da secreção de enzimas por parte de glândulas apicais.

Após penetração no hospedeiro, o miracídio perde os cílios (cutícula ciliada), migra através dos vasos sanguíneos ou canais linfáticos até à região periesofágica e transforma-se em esporocisto. O crescimento do esporocisto ocorre no hepatopâncreas, localizado na espiral superior da concha (Andrews, 1999), até atingir um tamanho máximo de 600 a 700 µm (Conceição, 2001). Cada esporocisto corresponde a uma estrutura em forma de saco com células germinativas, cujo

desenvolvimento dá origem a esporocistos de 2ª geração ou a rédias (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

2.5.1.4 Rédia

A rédia é alongada, tem forma cilíndrica, mede cerca de 1 a 3 mm de comprimento (figura 6) e tem alguma capacidade de movimentação. As suas migrações podem provocar graves lesões e morte do hospedeiro intermediário em infecções maciças (Andrews, 1999). Localiza-se no hepatopâncreas e já possui um esboço de tubo digestivo com boca, faringe e cego. As rédias podem dar origem a rédias de 2ª e 3ª geração ou a cercárias ou a ambas na mesma rédia. As novas formas libertam-se pelo tocostoma ou poro obstétrico.



Figura 6 - Rédia (adaptado de http://farm4.static.flickr.com/3300/3615839299_63cd0195de.jpg)

2.5.1.5 Cercárias

As cercárias de *Fasciola hepatica* são do tipo gimnocéfalas, com cauda direita e mais fina que o corpo (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999), assemelham-se a um girino e podem ter 300 µm de diâmetro e 600 µm de cauda (Jacquiet, 2008). Trata-se do último estágio larvar no interior do molusco e a sua estrutura aproxima-se bastante da forma adulta, com um sistema digestivo muito semelhante e esboços dos aparelhos reprodutores e excretor. Dentro do mesmo caracol podem existir várias fases larvares (Andrews, 1999).

2.5.1.6 Metacercárias

Após 7 a 8 semanas da infecção (em condições ideais) (Dreyfuss, Alarion, Vignoles & Rondelaud, 2006), as cercárias abandonam o caracol devido à elevação da temperatura e a uma luminosidade intensa. A emissão não ocorre abaixo dos 12°C nem acima dos 25°C. Após a emissão, as cercárias perdem a cauda e em cerca de 30 minutos fixam-se através da ventosa ventral a plantas, e segregam uma substância gelatinosa que solidifica rapidamente, enquistando-se e transformando-se em metacercárias (figura 7). Estas são a forma infectante para o hospedeiro definitivo e

são réplicas juvenis do parasita adulto (Jacquiet, 2008). Surgem como pequenas formações brancas, com o volume de cabeça de alfinete, com 0.20 a 0.25 mm, semelhantes a grãos de areia (Silva Leitão, 1983a)

O quisto é constituído por uma parede externa com duas membranas, uma exterior de natureza proteica e uma interior fibrosa e a parede interna constituída também por duas membranas, a primeira de natureza polissacárida e a segunda corresponde a lamelas de proteína envolvidas numa matriz de lipoproteínas (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).



Figura 7 - Metacercária (adaptado de <http://workforce.cup.edu/buckelew/images/Fasciola%20hepatica%20metacercaria.jpg>)

Desta forma, a metacercária consegue sobreviver no ambiente exterior sob certas condições de temperatura e humidade. Tolerando melhor o frio e temperaturas muito baixas (abaixo de -10°C), mas são bastante sensíveis ao calor e à dessecação. Estudos realizados nesta área mostraram que as metacercárias podem ser patogénicas durante 92 dias a -2°C , 130 dias a 10°C , 26 dias a 25°C e 14 dias a 30°C . Também demonstraram que a taxa de mortalidade das metacercárias é influenciada pela humidade relativa, variando inversamente. Em certas pastagens a secura e o calor do Verão matam as metacercárias no campo (Silva Leitão, 1983). Podem sobreviver algum tempo no feno (Meek & Morris, 1979) mas não na silagem (se bem armazenada) e está ainda descrito que algumas das cercárias emitidas (10%) podem contribuir para a difusão da infecção a certas distâncias, através da flutuação das mesmas (Heppleston, 1972; Andrews, 1999).

2.5.2 Fase intramamífero

A infecção do bovino ocorre enquanto se alimenta na pastagem, embora também seja possível que ocorra em animais estabulados através de água contaminada, feno ou silagem mal produzida. No entanto, nem todas as metacercárias ingeridas conseguem alcançar o fígado e muitas perdem-se nas fezes ou em migrações intraorgânicas (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). Após a ingestão as metacercárias desenquistam, o que ocorre em duas fases:

- fase de activação, no rúmen, devido a altas concentrações de CO₂, ambiente redutor e temperatura de 39°C

- fase de emergência, no intestino delgado, abaixo da abertura do ducto colédoco que é desencadeada pela bÍlis e pela acção de uma enzima do próprio parasita que induz movimentos musculares no parasita (Heras, 1974; Andrews, 1999). Uma vez libertas, as jovens fasciolas (adolescercárias) atravessam a parede intestinal, migram através da cavidade peritoneal durante as próximas 24 horas (Jacquiet, 2008) e chegam ao fígado onde começam a perfurar a cápsula de Glisson às 90 horas pós infecção (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). As adolescercárias migram pelo parênquima hepático durante cerca de 7 semanas, após as quais penetram nos ductos biliares onde alcançam a maturidade sexual em 4 semanas (figura 8) e começam a eliminar ovos para a bÍlis e mais tarde nas fezes, completando assim o ciclo de vida. O período pré patente é de cerca de 12 semanas, logo o período mínimo para se completar um ciclo completo é 17 a 19 semanas (Mitchell, 2002).



Figura 8 - Parasita adulto (adaptado de <http://www-naweb.iaea.org/nafa/aph/images/fasciola-project-2.jpg>)

As fasciolas imaturas podem atravessar o perítoneu ou passar à corrente sanguínea e serem transportadas a outros locais como pulmão, pâncreas, rim, coração, linfonodos, timo e alguns podem infectar o feto em animais gestantes (Andrews, 1999)

2.6 Algumas características

Existem alguns factores no desenvolvimento de *F. hepatica* que predisõem ou facilitam a propagação da doença:

- O número de ovos eliminados pelas fezes pode chegar a valores como 20.000/dia (Andrews, 1999), no entanto, depende de factores relacionados com o hospedeiro e com o parasita: varia bastante consoante a hora do dia, os diferentes dias e meses, o grau de parasitismo (Heras, 1974), duração da infecção, reinfecções, a alimentação (influencia o esvaziamento biliar) (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999) e a variabilidade individual (Heras, 1974).

- A multiplicação assexuada por *Fasciola hepatica* dentro do molusco origina uma amplificação significativa do parasita, um só miracídio pode dar origem a mais de 300 cercárias (Dreyfuss *et al*, 2006). A produção de cercárias depende de factores ambientais que afectem o processo fisiológico do caracol e características do próprio hospedeiro intermediário, como o tamanho e estado nutricional do molusco (Vignoles *et al*, 2010).
- Quando as condições são adversas para o caracol, as rédias em vez de produzirem directamente cercárias, produzem rédias de 2ª geração para aumentar o número de cercárias e assim poder compensar a possível destruição de algumas delas pelas condições climáticas ou nutricionais desfavoráveis (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).
- Um estudo realizado na Grã-Bretanha na década de 1960, citado por Mage, Bourgne, Toullieu, Rondelaud, & Dreyfuss (2002), revela que a prevalência da infecção natural de *L. truncatula* é normalmente inferior a 2% e pode aumentar até 20% ou mais quando as condições são favoráveis para a eclosão dos ovos do parasita.
- Muitas vezes a libertação da cercária está relacionada com o habitat e com comportamentos do hospedeiro definitivo, assim a marcada periodicidade diurna da emergência das cercárias parece coincidir com os períodos de actividade do hospedeiro definitivo (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). Existe uma periodicidade de 6 a 8 dias na eclosão das cercárias em que o número de cercárias por onda de eliminação é máximo na 2ª onda e diminui progressivamente até à 5ª onda (Vignoles, Alarion, Bellet, Dreyfuss & Rondelaud, 2006).
- Regra geral, as metacercárias, quando enquistadas no exterior tornam-se infectantes em 24 horas (Andrews, 1999). O invólucro protege-as da influência desfavorável do frio, calor, dessecação, bactérias, fungos e permite que elas sobrevivam no meio externo longos períodos de tempo (até 12 meses), o que aumenta o risco de infecção para o hospedeiro definitivo. A capacidade infectante está relacionada com as condições climáticas a que as cercárias estiveram sujeitas depois do enquistamento e durante o desenvolvimento larvar dentro do molusco (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

2.7 Mecanismos de Patogenicidade

Os mecanismos de patogenicidade estão divididos em directos e indirectos. Os efeitos directos são consequência da invasão, estabelecimento, alimentação e multiplicação no hospedeiro. Os indirectos têm, com frequência, uma maior influência que os directos na produtividade e bem-estar do hospedeiro. As acções de *F. hepatica*

incluem a ingestão e destruição de tecidos e sangue, uma vez que são histiófagos na fase imatura e hematófagos na fase adulta. Produzem irritação das superfícies epiteliais com as quais entra em contacto, devido ao seu tegumento espinhoso. Durante as migrações pode veicular outros agentes infecciosos, pode provocar obstrução do fluxo biliar e facilitar a multiplicação e patogenia de agentes que em condições normais não provocariam doença (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

2.8 Hospedeiro Intermediário

2.8.1 Classificação

O hospedeiro Intermediário de *Fasciola hepatica* pertence ao Reino Animalia, Subreino Metazoa, Filo Mollusca, Classe *Gastropoda*, Subclasse *Pulmonata*, Ordem *Basommatophora*, Família *Lymnaeidae*, Género *Lymnea* e quanto à espécie, a preferencial é *Lymnea truncatula* (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

2.8.2 Características gerais

Os moluscos são animais de corpo mole que a partir dos seus antepassados marinhos puderam adaptar-se ao meio terrestre graças ao desenvolvimento de “pulmões”. São características da família:

- A cabeça bem desenvolvida que se prolonga pelo focinho onde se abre a boca. É na cabeça que estão os tentáculos e órgãos dos sentidos
- O pé, que é um órgão musculado e serve para a locomoção
- O saco visceral constituído pelo aparelho digestivo com as glândulas; pelo aparelho circulatório com o coração, vasos e lacunas; os rins; e o aparelho reprodutor – hermafrodita. A massa visceral encontra-se em posição dorsal envolvida pelo manto e protegida pela concha.
- O manto ou *pallium* é pigmentado, corresponde a uma prega saliente e periférica do tegumento dorsal que cobre a massa visceral. Forma à volta do corpo do molusco uma cavidade – cavidade paleal ou cavidade branquial. O manto fecha-se em forma de saco comunicando com o exterior pelo pneumostoma. O bordo do manto é responsável pela produção da concha.

A concha é constituída por três camadas de material azotado, calcite e calcário. É denominada de aragonite e compreende uma só peça enrolada em espiral.

A reprodução é geralmente sexuada apesar dos moluscos do género *Lymnaea* serem hermafroditas de desenvolvimento directo.

O sistema nervoso é constituído por gânglios dispostos à volta do esófago.

Não são operculados, a respiração faz-se através de um sistema de vasos que se encontram no tecto da cavidade paleal e que funciona como pulmão.

2.8.3 Morfologia de *L. truncatula*

A concha é piramidal com 5-6 voltas truncadas e o enrolamento tem orientação da esquerda para a direita. As voltas crescem lentamente, a volta do corpo é a maior e por vezes bastante larga. A espiral é muito alta, termina de forma arredondada e o diâmetro da abertura é cerca de um terço do comprimento da concha e o corpo da espira ocupa mais do que metade do comprimento da concha. A abertura tem tendência a ser de forma romboide. O lábio interno está rebatido e forma uma projecção achatada bastante extensa, que se projecta sobre o *umbilicus*. Na concha as estrias da espira estão ausentes ou muito pouco desenvolvidas (figura 9).



Figura 9 - *Lymnaea truncatula* (adaptado de <http://www.animalpicturesarchive.com/ArchOLD-7/1190721663.jpg>)

A morfologia do aparelho reprodutor é característica da espécie. Possui um pénis e uma bainha do pénis relativamente curtos e uma próstata com uma prega simples e pequena que fica em continuidade com uma bolsa, de superfície lisa e lúmen alargado.

Relativamente à rádula, a principal característica é o facto do primeiro dente lateral ser tricúspide. (Conceição, 2001)

Após alcançar o estado adulto, medem cerca de 6-8 mm, no entanto o desenvolvimento, medido pelo comprimento da concha, é influenciado pela alimentação (Heras, 1974).

2.8.4 Ciclo de vida

São hermafroditas, mas além da reprodução assexuada, também está comprovada a fecundação cruzada (Conceição, 2001). Põem ovos na lama ou na água ao longo de todo o ano sob a forma de “clusters” envolvidos numa camada muco-gelatinosa, em número variado. A quantidade de ovos depende, entre outros factores, da temperatura e da disponibilidade de alimento. O maior índice de ovopostura verifica-se no mês de

Agosto e os mais bem alimentados têm maior taxa de postura. O período de incubação também varia com a temperatura e está descrito uma duração mínima de 11-12 dias a 21-30°C.

Uma vez nascidos, os caracóis começam logo a alimentar-se sozinhos, têm um desenvolvimento rápido e alcançam a maturidade aos 20 dias (Heras, 1974).

2.8.5 Biótipo/Ecologia

Estes moluscos têm uma distribuição geográfica muito ampla. Os seus habitats podem ser permanentes como charcas, cursos de água, margens de rios, etc., (Mitchell, 2002) e temporários. Estes últimos podem-se revelar locais bastante perigosos, uma vez que é onde se multiplicam exponencialmente, invadindo as pastagens principalmente em anos húmidos e quando as condições hidrológicas da zona são favoráveis (inundações, alagamentos) (Crossland, 1976). Após épocas de grande pluviosidade os habitats temporários podem ser constituídos por marcas de cascos, sulcos de rodas, qualquer depressão que contenha água pode servir como fonte de infecção durante épocas com chuvas fortes (Mitchell, 2002). Alguns estudos sugerem que os caracóis normalmente permanecem no mesmo habitat durante o ano e que a sua dispersão pode ser consequência de movimentos activos, transporte por flutuação ou por mamíferos e aves (Heppleston, 1972).

Podem encontrar-se em quase todo o tipo de solos, no entanto preferem terrenos argilosos, com dificuldades de drenagem (Crossland, 1976). Heras (1974) refere ainda que existem plantas que só por si podem fazer suspeitar da presença de caracóis (juncos, ranúnculos, verónicas, festuca) (figura 10).

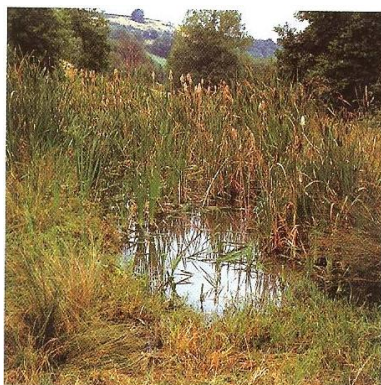


Figura 10 - Habitat dos moluscos (adaptado de <http://www-naweb.iaea.org/nafa/aph/images/fasciola-project-3.jpg>)

L. truncatula desenvolve-se em habitats semi-aquáticos, águas claras, paradas ou de pequena corrente, a profundidades máximas de 10 a 20 cm (Leitão, 1983). As condições ideais correspondem a um pH levemente ácido, sendo os níveis de pH

excessivamente ácidos prejudiciais como ocorre em zonas pantanosas e áreas de musgo e um meio hídrico de movimento lento. Alimentam-se de algas (Mitchell, 2002) e a temperatura ideal para o desenvolvimento é entre 18 a 21°C, abaixo dos 4°C o desenvolvimento é retardado (Conceição, 2001). Num ensaio realizado em caracóis adultos e caracóis jovens expostos a baixas temperaturas (5°C), os autores revelam que os jovens podem beneficiar desta exposição quando voltam às temperaturas ideais, uma vez que foi observada uma grande actividade e apetite, crescimento rápido, tendência para o aumento do tempo de vida e maior descendência relativamente aos que não foram sujeitos a baixas temperaturas. Estes resultados indicam que em condições naturais, após o Inverno, a maioria dos caracóis de uma população deve corresponder à fracção jovem (Hodasi, 1976).

2.8.6 Factores que afectam o desenvolvimento do molusco

Os factores climáticos afectam directamente a sobrevivência e a reprodução dos gastrópodes. Estes podem resistir a grandes períodos de seca (estivação) e a baixas temperaturas (hibernação) sendo, apesar deste facto, o seu desenvolvimento marcadamente mais lento ou interrompido durante estes períodos (Yilma & Mesfin, 2000). Quando as condições são desfavoráveis, os caracóis penetram no interior da terra à procura de humidade, permanecendo durante longos períodos em estivação, o que lhes permite resistir segundo Heras (1974) durante 5 anos sem receber qualquer humidade. O processo de estivação é estimulado externamente pela dessecação e durante estes períodos o metabolismo basal dos moluscos é reduzido, tal como acontece durante a hibernação.

A densidade populacional é um dos factores que varia inversamente com o desenvolvimento e a fertilidade do molusco (Conceição, 2001). A alimentação tem um efeito directo sobre o crescimento do caracol, além do desenvolvimento das formas larvares no seu interior. Quanto melhor for o estado de nutrição dos moluscos, maior é o número de formas larvares no seu interior (Ollerenshaw, 1971). A idade dos caracóis também é factor importante para o parasitismo, quanto mais jovem for o caracol, mais capacidade tem para atrair o miracídio (Andrews, 1999). O parasitismo dos caracóis nem sempre é inconsequente, com alguma frequência e quando é muito elevado, os caracóis podem morrer (Silva Leitão, 1983).

Sob condições ideais de temperatura, humidade, e alimentação, a taxa de reprodução é alta e em 2 semanas a infecção por *Fasciola hepatica* provoca paragem da postura de ovos e um crescimento rápido do molusco (gigantismo parasitário) (Wilson & Denison, 1980)

Nem todas as populações de caracóis são capazes de manter o desenvolvimento larvar completo de *F. hepatica*, uma vez que a mortalidade dos caracóis, a prevalência da infecção dos caracóis e o número de cercárias produzido são muito variáveis de acordo com a localização (Dreyfuss *et al*, 2006).

2.8.7 Susceptibilidade/Resistência

A incompatibilidade entre as espécies de *Lymnaea* e *F. hepatica* é manifestada por resistência absoluta, resistência em função da idade, baixa susceptibilidade e alta mortalidade nos adultos. Um hospedeiro não apropriado, ainda que se deixe infectar, exerce um efeito supressivo no desenvolvimento do parasita.

Também há estudos que demonstram a importância do hospedeiro definitivo na capacidade de propagação da infecção por parte da *Lymnea truncatula*, ou seja, os caracóis infectam-se e libertam cercárias mais ou menos facilmente consoante a espécie do hospedeiro definitivo (Vignoles, Ménard, Rondelaud, Agoulon & Dreyfuss, 2004).

Em Portugal, estudos de susceptibilidade a alguns moluscos em infecção experimental por *F. hepatica*, demonstraram que apenas *L. truncatula* é susceptível e a única que se encontra parasitada na natureza (Conceição, 2001).

Apesar de diferentes caracóis do género *Lymnaea* poderem ser infectados por *F. hepatica*, *Lymnaea truncatula* é o hospedeiro intermediário predominante. Está provado que o parasita exerce efeitos nefastos no seu hospedeiro intermediário, incluindo castração ou diminuição da fertilidade, aumento da mortalidade, destruição da glândula digestiva, alterações metabólicas (deslocação da energia da reprodução para o crescimento, induzindo gigantismo), aumento da sensibilidade ao stress ambiental. Infecções experimentais revelam que o parasita induz elevada mortalidade em caracóis provenientes de populações com baixas prevalências naturais em comparação com aqueles provenientes de populações com prevalências elevadas. No entanto, outros estudos indicam a possibilidade de co-adaptação entre hospedeiro e parasita (Hurtrez-Boussès, Cécile, Durand & Renaud, 2001).

2.9 Hospedeiro definitivo

Fasciola hepatica é responsável por causar parasitose em bovinos, ovinos e humanos podendo também infectar outros ruminantes como os caprinos, zebus, búfalos, etc; carnívoros, porcos e equinos, embora com menor incidência. Alguns mamíferos selvagens são também alvo deste parasita, como a lebre, o coelho, cervídeos, javali (Sousa, 2001) e até pequenos roedores (Conceição, 2001). E foi ainda descrita a infecção em aves (Vaughan, Charles & Boray, 1997).

Hoje em dia admite-se que o maior grau de infecção dos ovinos seja devido à localização mais baixa das metacercárias nas folhas das pastagens. Enquanto que os bovinos comem a porção mais alta das folhas os ovinos comem as porções mais baixas, tendo maior probabilidade de se infectar (Brito, 1997).

2.10 Fasciolose Bovina

2.10.1 Epidemiologia

Os factores climáticos têm grande influência na prevalência e gravidade da infecção parasitária nos bovinos (Rangel-Ruiz, Marquez-Izquierdo & Bravo-Nogueira, 1999). A presença de *Fasciola hepatica* depende dos factores que controlam a existência dos moluscos hospedeiros intermediários, ou seja, a existência de habitats adequados (já descritos) (Pritchard, Forbes, Williams, Salimi-Bejestani & Daniel, 2005) e condições ambientais favoráveis, fundamentalmente a humidade e a temperatura (Rangel-Ruiz *et al*, 1999). Humidade suficiente e temperatura adequada são necessárias para a reprodução dos caracóis, para o desenvolvimento dos miracídios e das restantes formas larvares (Armour, 1975). Nas zonas temperadas da Europa, as baixas temperaturas representam um factor limitante na progressão do ciclo de vida. Para que os caracóis se reproduzam e para o desenvolvimento de *F. hepatica* no seu interior é necessária uma temperatura diurna/nocturna média de 10°C ou mais e toda a actividade cessa a 5°C. Quando as temperaturas sobem para 15°C e se mantêm acima deste nível ocorre multiplicação significativa dos moluscos e das formas larvares dos tremátodes (Urquhart *et al*, 1996). Quanto à humidade, as condições ideais ocorrem quando a pluviosidade excede a evaporação e assim se atinge a saturação do meio ambiente. Estas condições, também favorecem o desenvolvimento dos ovos de *F. hepatica*, a procura de caracóis pelos miracídios e a dispersão das cercárias após a saída dos caracóis. A falta de humidade abranda o ciclo (Mitchell, 2002), mas por outro lado, o tempo seco incita os animais a procurar mais humidade, zonas com água (possíveis habitats de Limnídeos), o que predispõe à infecção.

Nas zonas temperadas da Europa a transmissão do parasita ao hospedeiro intermediário e o seu desenvolvimento ocorre principalmente entre Maio e Outubro (Armour, 1975). A densidade máxima de metacercárias na erva surge no fim do Verão e Outono, as manifestações clínicas aparecem, normalmente, no fim do Outono e durante o Inverno (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). Esta corresponde à infecção de Verão dos caracóis, em que aparecem metacercárias na pastagem de Agosto a Outubro. Estas infecções originam-se a partir de miracídios que eclodiram de

ovos excretados na Primavera ou início de Verão ou de ovos que sobreviveram ao Inverno. O desenvolvimento no caracol ocorre durante o Verão e as cercárias são eliminadas de Agosto a Outubro. Mas também pode ocorrer a infecção de Inverno dos caracóis, em que as metacercárias aparecem na pastagem na Primavera (Maio a Junho) e os animais infectados mais cedo. São provenientes de caracóis que foram infectados no Outono anterior e nos quais o desenvolvimento larval foi interrompido temporariamente durante o período de hibernação de Inverno do hospedeiro. Tanto os ovos como as metacercárias de *F. hepatica* podem sobreviver durante o Inverno e desempenham papéis importantes na epidemiologia: os ovos porque eclodem em miracídios no final da Primavera e podem infectar os caracóis; as metacercárias, porque infectam os animais no início da Primavera, o que resulta na viabilidade dos ovos em meados do Verão (Ollerenshaw & Rowlands, 1959; Ollerenshaw, 1971). A resistência das metacercárias às condições ambientais desfavoráveis do Inverno, permite que haja uma quantidade residual de metacercárias infectantes a somar às que são produzidas na Primavera. No entanto, se as temperaturas durante o Inverno forem muito baixas, a sobrevivência destas fases fica comprometida.

Outro factor a considerar na epidemiologia é o sistema de pastagem utilizado. Pode verificar-se a contaminação contínua de pastagens utilizadas por ovinos cronicamente infectados, nos quais, as fasciolas têm esperança de vida semelhante ao hospedeiro. Grandes cargas parasitárias são frequentes nos ovinos e um só animal pode eliminar 2-3.5 milhões de ovos por dia (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). Além disso, os animais silvestres, como o javali e a lebre também podem actuar como reservatório de *F. hepatica* e serem responsáveis pela manutenção da infecção na ausência de bovinos e ovinos ou na sua disseminação (Pritchard *et al*, 2005). O sistema de transumância que ocorre em algumas regiões também pode ter influência sobre as populações de parasitas, ao disseminá-las à distância.

O potencial biótico de *L. truncatula* é muito elevado, podendo-se formar a partir de um só indivíduo 25.000 novos exemplares em cerca de 12 semanas se as condições ambientais forem favoráveis (Crossland, 1976). A actividade dos caracóis inicia-se na Primavera, no entanto se as temperaturas médias dia/noite não descenderem abaixo dos 10°C e se houver humidade suficiente, podem manter-se activos durante todo o ano. Em verões secos e quentes, podem estar, no entanto as fontes, bebedouros e zonas de regadio permitem grandes concentrações de caracóis (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

Estudos de prevalência mostram a influência significativa do tipo de manejo nas infecções por *F. hepatica* em bovinos. É verificada uma maior prevalência em explorações tradicionais de grande escala em comparação com as produções em

pequena escala, o que pode ser atribuído ao elevado potencial biológico do hospedeiro intermediário e medidas insuficientes de tratamento e controlo. Quando é avaliada a prevalência de *F. hepatica* pela idade, os dados indicam que os animais com mais de 2 anos de idade tiveram maior prevalência do que os mais novos. A maior incidência em bovinos mais velhos pode ser devido à maior frequência de pastoreio, aumentando a possibilidade de infecção pelas metacercárias. No que diz respeito ao sexo, alguns autores não obtiveram diferenças significativas nos resultados, em bovinos, enquanto que outros relataram uma taxa de prevalência significativamente maior em fêmeas. Esta taxa de prevalência pode ser atribuída ao facto de que a maior parte ou todas as fêmeas serem mantidas para reprodução e produção de leite. Em relação à raça, alguns autores sugerem que não há diferenças de prevalência entre raças, ao passo que outros referem o contrário, ainda que a maior prevalência numa determinada raça possa coincidir com o tipo de alimentação (Yildirim, Ica, Duzlu & Inci, 2007).

2.10.2 Fisiopatologia

A patogenia da fasciolose depende do número de parasitas que invadem o fígado (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999) e está associada aos efeitos mecânicos e químicos dos parasitas e da resposta inflamatória e imunitária do hospedeiro.

Os danos causados pela fasciola são essencialmente hepáticos. Incluem lesões no parênquima hepático resultantes da migração das jovens fasciolas imaturas e lesões nos ductos biliares devido à presença das fasciolas adultas (Jacquiet, 2008).

2.10.2.1 Localizações ectópicas

Algumas fasciolas, podem, por acidente entrar nas veias hepáticas e sistema circulatório para se alojarem em locais invulgares. Já foram descritas infecções intrauterinas (Stalker & Hayes, 2007) e um estudo feito em 661 bezerras mostrou uma prevalência de 7.9% e ainda a eliminação de ovos nas fezes por uma bezerra com 4 dias de idade (Heras, 1974). As lesões provocadas por formas parasitárias de *F. hepatica* podem estar presentes nos pulmões sob a forma de granulomas. O parasita é resistente à morte intracelular por parte das células fagocíticas e à resposta inflamatória aguda persistindo no tecido afectado por muito tempo e provocando uma pneumonia granulomatosa (López, 2001).

2.10.2.2 Destruição do parênquima hepático

Quando um grande número de metacercárias é ingerido ao mesmo tempo, as fasciolas imaturas provocam uma destruição do parênquima hepático e formam,

durante a sua migração, trajectos hemorrágicos e tortuosos. Isto provoca uma inflamação e destruição das células hepáticas (Jacquiet, 2008).

Após a ingestão das metacercárias, saída do quisto no tracto gastrointestinal e emergência dos juvenis recém desenquistados, a primeira interacção entre parasita e tecido do hospedeiro ocorre com a migração através da parede intestinal e pela cavidade peritoneal. A migração através dos tecidos do hospedeiro é realizada com a ajuda das espinhas do tegumento do parasita e também da secreção de enzimas proteolíticas (Andrews, 1999). Uma vez chegadas à cápsula do fígado, a penetração no parênquima hepático requer novamente a combinação de acções mecânicas (através das espinhas do tegumento) e químicas (enzimas proteolíticas) (Gajewska, Smaga-Kozłowska & Wiśniewski, 2005). Devido à posição do fígado em relação ao intestino delgado, o maior número de parasitas migra e penetra a cápsula do lobo ventral do fígado, o que pode resultar em grandes hemorragias sub-capsulares. A migração das adolescecárias pelo parênquima hepático vai deixando trajectos hemorrágicos e áreas de necrose (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

Os parasitas adultos que estão presentes nos ductos biliares causam irritação mecânica devido à acção das ventosas e das espinhas. Como resposta o organismo modifica a sua estrutura e a mucosa torna-se espessada e hiperplásica resultando numa colangiohepatite. Os parasitas podem ainda provocar obstrução dos ductos biliares com algum grau de retenção biliar, predispõem a infecções bacterianas, sugam sangue e provavelmente produzem produtos tóxicos e excreções metabólicas irritantes para o hospedeiro (Stalker & Hayes, 2007). *F. hepatica* produz excreções muito escuras que contêm uma mistura de ferro e porfirina e são reponsáveis pela descoloração característica da bília que ocorre na fasciolose (Cullen & MacLachlen, 2001).

2.10.2.3 Produtos excreção/secreção

As fasciolas imaturas e adultas ao longo do ciclo de vida no interior do hospedeiro mamífero, produzem e libertam grandes quantidades de moléculas denominadas de produtos de excreção/secreção (ES) (Dixit, Dixit & Sharma, 2008). Durante a migração *in vivo* e cultura *in vitro*, os conteúdos do lúmen intestinal do parasita são regularmente regurgitados para as imediações do parasita (Beckham *et al*, 2009).

Neste grupo estão incluídas as Catepsinas L, que correspondem a proteinases e são um dos maiores constituintes destes ES. Estas enzimas estão implicadas em acções como, a progressão do parasita pelo intestino e parênquima hepático por destruição das proteínas intersticiais da matriz como a fibronectina, laminina e colagénio; a aquisição de nutrientes por catabolização das proteínas do hospedeiro em péptidos

absorvíveis; e na modulação do sistema imunitário do hospedeiro (Dixit *et al*, 2008) por clivagem das imunoglobulinas, redução da actividade dos linfócitos (Cancela *et al*, 2008), activação da via alternativa dos macrófagos (Flynn & Mulcahy, 2008). Foi ainda demonstrado que a catepsina L é capaz de suprimir a resposta imunitária Th1 em animais de laboratório infectados, tornando-os mais susceptíveis a infecções bacterianas concomitantes. Estas proteases são também descritas como marcadores específicos e sensíveis para o diagnóstico de fasciolose e a vacinação experimental de animais com estas enzimas resulta numa redução significativa na carga parasitária e na fertilidade (Dixit *et al*, 2008).

Enquanto as catepsinas L são predominantes nas fases adultas, há indicação de que a principal protease segregada pelas fases juvenis é da classe das catepsinas B (Wilson *et al*, 1998). A importância das catepsinas B está relacionada com a sobrevivência das formas juvenis, nomeadamente na invasão do hospedeiro através da parede intestinal. Estas enzimas têm actividade em ambientes ácidos (células gastrodérmicas do parasita) e neutros (tecidos/fluidos do hospedeiro) e são segregadas para os tecidos do hospedeiro nas primeiras 5 semanas de infecção. É sugerido que, ao contrário das catepsinas L, as catepsinas B são muito menos susceptíveis à inibição das cistatinas (proteínas inibidoras das proteases) do hospedeiro e também estas podem ser objecto de estudo para futuras terapêuticas ou vacinações (Beckham *et al*, 2009). Os helmintes podem expressar cistatinas para regular a actividade das proteases do próprio parasita. Dentro de um curto espaço de tempo após o desenquistamento, a expressão das catepsinas é activada para permitir a rápida penetração da parede intestinal do hospedeiro, por isso as cistatinas podem ser necessárias para proteger os jovens parasitas das suas próprias proteases. Estas cistatinas podem ter a função adicional de modulação do sistema imunitário, como a inibição da apresentação de antígenos, activação policlonal e indução da resposta Th2 (Khaznadji, Collins, Dalton, Bigot & Moiré, 2005).

Um outro constituinte dos ES, a tioredoxina peroxidase, também parece ser capaz de subverter a resposta do hospedeiro, por recrutamento e activação da via alternativa dos macrófagos (Donnelly, O'Neill, Sekiya, Mulcahy & Dalton, 2005). Foi demonstrado que o aminoácido prolina é produzido pelos parasitas adultos e pode estar envolvido na indução da hiperplasia do epitélio dos ductos biliares (Wolf-Spengler & Isseroff, 1983). Estes produtos em contacto estreito com o sistema imunitário do hospedeiro, induzem uma resposta anticorpo específica, que pode ser utilizada no imunodiagnóstico precoce de infecções por *F. hepatica* (Jacquiet, 2008).

2.10.2.4 Resposta do hospedeiro

2.10.2.4.1 Eosinofilia

A eosinofilia é um indicador de resposta imunitária em bovinos, aumenta significativamente durante a migração intrahepática das adolecercárias e permanece com níveis altos quando os parasitas adultos se encontram nos ductos biliares. Pode ainda ser considerada como um método de defesa para destruir o parasita e é a alteração sanguínea mais frequente na fasciolose. Vários estudos mostram a relação entre a presença de eosinofilia e a infecção por *F. hepatica* e concluem que há uma elevada prevalência de fasciolose em grupos de animais com eosinofilia, sugerindo que as infecções parasitárias devem ser consideradas como uma causa de eosinofilia, particularmente a fasciolose (Şimşek *et al*, 2006). Os eosinófilos libertam substâncias prejudiciais para o parasita, por desgranulação, ajudando assim a eliminá-lo (Jain, 1993).

2.10.2.4.2 Hiperplasia dos ductos biliares

Logo que as fascíolas penetram nos canais biliares, a hiperplasia epitelial (figura 11) é imediatamente significativa. O processo inflamatório torna-se rapidamente crónico, com fibrose, infiltração eosinofílica e linfocitária (Jacquiet, 2008). Num estudo, foi demonstrada a semelhança entre a hiperplasia biliar observada em ratos com fasciolose induzida experimentalmente e a originada pela administração de prolina na cavidade abdominal de ratos não infectados. Põe-se então a hipótese da prolina, que é sintetizada e eliminada em grandes concentrações por *F. hepatica*, ser mediador da resposta hiperplásica no decorrer da infecção, estimulando a deposição de colagénio (Isserof, Sawma & Reino, 1977).

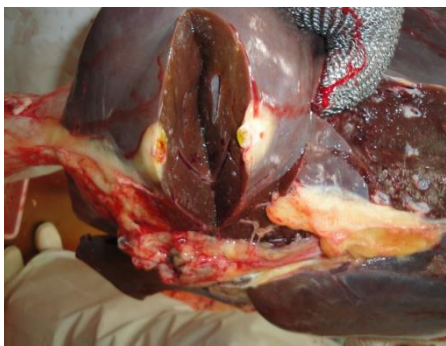


Figura 11 - Hiperplasia dos ductos biliares (original, matadouro de Tomar)

2.10.2.4.3 Icterícia

Nos bovinos as calcificações que se formam na parede dos canais biliares provocam o seu espessamento e endurecimento (colangiohepatite) (Jacquiet, 2008) com perda de elasticidade e o processo inflamatório cria uma obstrução mecânica através dos depósitos de detritos e dos próprios parasitas. Devido a estes dois factos é originada uma retenção biliar, caracterizada pela icterícia verificada em alguns casos, devido à absorção dos pigmentos biliares e sua passagem para o sangue durante a estase nos canalículos biliares (Heras, 1974). Esta estase juntamente com a descamação epitelial dos ductos causada pelos parasitas, predispõe à formação de cálculos (a fasciolose é uma causa de litíase) (Corrêa, 1976).

O espessamento dos ductos também condiciona consideravelmente a nutrição das fascíolas adultas, razão pela qual a sua sobrevivência não ultrapassa assim os 12 meses nos bovinos, ao contrário dos ovinos, nos quais este fenómeno não é observado e podem sobreviver vários anos (Jacquiet, 2008).

2.10.2.4.4 Anemia

A presença das fascíolas adultas nos ductos biliares coincide com o desenvolvimento gradual da anemia (Lee, Zimmerman & Duimstra, 1992). Estas observações ajudam a tirar conclusões relativamente à nutrição deste parasita, os adultos hematófagos e os jovens histiófagos. Através da marcação de eritrócitos com radioisótopos, calcula-se que a perda diária de sangue por parasita, seja de aproximadamente 0.5-1 mL (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). Apesar do facto de que os componentes proteicos do plasma serem reabsorvidos após digestão no intestino, há uma quantidade considerável de ferro que não é reabsorvida. Sob estas circunstâncias a taxa de eritropoiese aumenta, mas é limitada nas fases finais da infecção. Deste modo o último grau de anemia não está relacionado com a severidade da hemorragia biliar, mas sim com a capacidade eritropoiética do hospedeiro. Esta é influenciada pelos níveis de proteína e ferro disponíveis no organismo que por sua vez são dependentes da qualidade da dieta e da intensidade da anorexia. Juntamente com a hematofagia por parte dos parasitas adultos, um outro factor que pode contribuir para a anemia é a perda de sangue resultante das fases de penetração e migração das adolecercárias (Valero *et al*, 2008). Há ainda autores que consideram que a perda de sangue devido à alimentação do parasita não é suficiente para fazer baixar tanto o valor do hematócrito e da hemoglobina, uma vez que nas infecções prolongadas os parasitas localizados nos ductos fibrosados, espessados ou mesmo calcificados têm pouco acesso a tecidos vascularizados. Deste modo, põem a hipótese de serem os altos níveis de prolina, que é utilizada como forma de excreção do azoto, que

provocam supressão da hematopiese (Zimmerman, 1996). Alguns autores afirmam ainda que a anemia é devida à acção de uma toxina hemolítica segregada pelo parasita (Corrêa, 1976).

2.10.2.4.5 Enzimas hepáticas

A actividade plasmática de algumas enzimas pode estar aumentada em resposta à lesão hepática por passagem para a circulação (Anderson *et al*, 1977). O aumento da actividade plasmática da glutamato desidrogenase (GLDH), enzima mitocondrial dos hepatócitos, é indicadora de um processo agudo recente, diminuindo a sua actividade quando as fascíolas alcançam a maturidade sexual e se localizam nos ductos biliares. A actividade plasmática da aspartato aminotranferase (AST) e da sorbitol desidrogenase (SDH) também aumenta durante a migração dos parasitas pelo parênquima hepático, apesar de serem enzimas menos específicas. A gama-glutamil transpeptidase (GGT) originada no epitélio dos ductos biliares, alcança os valores plasmáticos mais elevados quando os trematodes se encontram nos ductos biliares (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

2.10.2.4.6 Hipoalbuminemia e Hiperglobulinemia

A mucosa biliar hiperplásica torna-se hiperpermeável a macromoléculas uma vez que os complexos de união entre as células da mucosa dos ductos biliares abrem-se, permitindo a passagem das proteínas plasmáticas desde a corrente sanguínea até à árvore biliar (Lee *et al*, 1992).

Os baixos níveis de albumina resultam da passagem desta da corrente sanguínea através do epitélio inflamado dos ductos biliares, da hematofagia das fascíolas adultas (Jacquie, 2008) e da falta de síntese proteica pelos hepatócitos. A diminuição da albumina comparada com as globulinas desenvolve-se em duas fases: a primeira fase coincide com o período de migração do parasita e é caracterizada por uma hipoalbuminemia moderada e uma hiperglobulinemia pronunciada. A segunda fase, que está associada à presença de parasitas adultos nos ductos biliares, é caracterizada por uma maior diminuição dos níveis de albumina assim como uma redução progressiva na concentração das globulinas. A hiperglobulinemia é devida ao aumento da síntese de imunoglobulinas em resposta aos antígenos parasitários. Quanto à albumina, durante a fase migratória há uma combinação entre a redução da síntese de albumina e expansão do volume plasmático. Durante a fase biliar a hipoalbuminemia está relacionada com a perda de albumina para o intestino e com a taxa de síntese de albumina e taxas totais do catabolismo da albumina, que por sua vez estão relacionadas com os níveis de nutrição, apetite e carga parasitária. O

aumento da síntese de albumina provavelmente desvia os aminoácidos disponíveis do metabolismo proteico (músculo, leite), contribuindo para os baixos níveis de produtividade que se verifica nos animais com fasciolose (Mehlhorn, 2001). A hipoalbuminemia interfere com o transporte de moléculas pela corrente sanguínea, podendo levar ao mau anabolismo e disfunção de alguns órgãos. Dependendo da gravidade e da variação individual a hipoalbuminemia pode provocar diminuição na pressão oncótica com a passagem do fluido do espaço vascular para o espaço extravascular, o que leva ao aparecimento de edema nas zonas mais baixas do corpo (Radostitis, Gay, Hinchclitt & Constable, 2007). Alguns estudos realizados demonstram a relação entre a anemia e a hipoalbuminemia e a passagem de sangue para o intestino via biliar, o que representa uma perda considerável de glóbulos vermelhos e proteínas. Apesar de muitas destas proteínas serem catabolizadas e reabsorvidas como aminoácidos, o animal afectado deve resintetizar diariamente uma grande quantidade de proteínas. Ao longo da infecção, o fígado encontra-se num estado hipercinético, no que diz respeito às proteínas plasmáticas com um aumento da síntese de hemoglobina, albumina e imunoglobulinas. No entanto, nos estados mais avançados, a capacidade do hospedeiro para aumentar a síntese de hemoglobina em resposta à hemorragia está comprometida pela falta de ferro e proteínas (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

2.10.2.4.7 Perda de condição corporal

O crescimento corporal, assim como as proteínas plasmáticas e os eritrócitos mantêm-se até à maturidade sexual das fasciolas nos ductos biliares (8-12 semanas pós infecção), a partir de então a diminuição do peso e a emaciação consequente coincidem com o aumento da anemia. A anorexia que acompanha a fasciolose é em parte responsável pela hipoproteinemia e da perda de peso. A ingestão voluntária de alimento diminui progressivamente após a infecção e torna-se mais intensa no final da fase de prepatência, momento em que a lesão hepática originada pelos parasitas imaturos é máxima. Em processos mais graves, a depressão do apetite mantém-se e inclusivamente aumenta com a patência e deterioração física do animal (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). A redução da ingestão conduz a uma redução na eficiência da utilização da energia metabolizável e diminuição na deposição de proteína na carcaça (Radostitis *et al*, 2007). Alguns estudos realizados em ovinos sugerem que não há relação directa entre a carga parasitária e a anorexia. Outros trabalhos estudam alguns factores que possam estar implicados na actividade hipotalâmica reguladora do apetite, como a dor, a destruição de receptores específicos ou alterações na concentração de certas hormonas (colecistoquinina), sem que se

possa determinar com segurança as razões da anorexia durante a infecção por *F. hepatica*. Existe alguma relação entre o aparecimento e a intensidade da inaptidão com a diminuição da capacidade metabólica do fígado e com o desenvolvimento da anemia e perda de proteínas plasmáticas associadas às fasciolas adultas. Deste modo surge a hipótese da anemia, hipoalbuminemia e a deterioração das reservas proteicas extravasculares estarem de alguma forma implicadas na perda de apetite (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

As fortes lesões no tecido hepático, afectam o metabolismo dos animais doentes, originando sérios transtornos na nutrição, que juntamente com a absorção contínua e constante dos produtos tóxicos dos parasitas e de outros agentes que possam existir junto ao parasita ou nas vias biliares danificadas, são a causa do estado depressivo dos indivíduos parasitados. Entre as alterações metabólicas observadas, há que destacar a das gorduras que se pode manifestar por uma hipercolesterolemia e fezes esteatorreicas. Alguns investigadores suspeitam também de distúrbios no metabolismo das vitaminas do complexo B, chegando inclusivamente a presenciar alguns estados de carência. Tendo em conta que os constituintes do complexo vitamínico B são importantes para o metabolismo hepático da glucose, gordura e proteínas, entre outras funções fisiológicas, assim se compreende a importância das lesões hepáticas nesta doença. Por outro lado, a carência de vitamina do complexo B leva a uma diminuição do apetite que conduz inequivocamente a uma desnutrição geral e a um grave problema no metabolismo dos hidratos de carbono e gorduras, o que contribui, em parte, para a baixa condição corporal clássica nos animais doentes. Obtiveram-se bons resultados na prática com o enriquecimento do tratamento específico com esta classe de vitaminas.

Têm-se observado em animais com fasciolose variações na composição da biliar e consequentemente alterações da flora intestinal e da digestão, verificando-se frequentemente distúrbios entéricos, como diarreia, constipação, timpanismo, fermentações anormais, etc. (Heras, 1974).

2.10.2.4.8 Infecções secundárias

Há evidência que a infecção por *F. hepatica* torna os animais mais susceptíveis à infecção por outros agentes (*Salmonella*, *Clostridium*) (Vaessen, Velin, Frankena, Graat & Klunder, 1998). Os estudos realizados nesta área sugerem que a susceptibilidade a estas infecções secundárias é devida à regulação do sistema imunitário do hospedeiro pelo parasita, como a polarização da reposta imunitária para fenótipos Th2 e T_{reg} que impedem o desenvolvimento de uma resposta protectora tipo Th1 (Jacquiet, 2008).

Após a passagem dos parasitas através da parede intestinal e cavidade peritoneal, estes alcançam o fígado e fazem migrações pelo parênquima hepático até aos ductos biliares. Destas migrações podem resultar uma variedade de sequelas, tais como peritonite aguda, abscessos hepáticos, morte como consequência de necrose aguda com infiltração maciça de parasitas imaturos e a proliferação de esporos de *Clostridium haemolyticum* ou *Clostridium novyi*. Os esporos do *Cl. haemolyticum* são ingeridos pelos bovinos e alojam-se nas células de Kupfer (Cullen & MacLachlen, 2001), mas só proliferam em áreas com baixa tensão de oxigénio, como o parênquima hepático necrosado produzido pela migração dos parasitas imaturos. Deste modo os esporos podem germinar e provocar doença aguda e altamente fatal, hemoglobinúria bacilar (Takagi *et al*, 2009). Da mesma forma os esporos inactivos do *C. novyi* tipo B podem germinar nos focos de necrose deixados pelas adolecercárias e dar origem à Hepatite Necrótica Infecciosa ou “Black disease” (VLA, 2010; Cullen & MacLachlen, 2001).

Foi ainda descrita a correlação entre bovinos infectados com *F. hepatica* e patologia renal após a verificação da ocorrência de lesão renal devido à formação e fixação de complexos imunes nos glomérulos renais, provocando uma glomerulonefrite (Marques, Scroferneker & Edelweiss, 2005).

2.10.2.5 Uma resposta imunitária adaptada

Uma característica das infecções sistémicas provocadas por helmintes é a sua cronicidade, o que reflecte o sucesso do parasita à evasão da resposta imunitária do hospedeiro. Esta capacidade depende de uma série de adaptações que permitem evitar ou resistir a um ataque do sistema imunitário. Além disso o longo tempo de sobrevivência destes parasitas no hospedeiro está associado ao desenvolvimento de uma resposta Th2 que impede uma resposta protectora Th1 e controla a inflamação excessiva que pode ser prejudicial para o hospedeiro e também para o parasita. Assim é sugerido que o parasita induz um efeito imunossupressivo de forma a prevenir a resposta imunitária inata e consequentemente suprimir a resposta imunitária adaptada (Falcón *et al*, 2010). Os bovinos infectados apresentam uma resposta imunitária do tipo Th2 caracterizada pela produção de Interleucina-4 (IL-4), eosinofilia e uma resposta imunoglobulina específica G1 (IgG1) com pouca ou nenhuma IgG2 (Brown, Davis, Dobbelaere & Rice-Ficht, 1994; Clery & Mulcahy, 1998). Estudos sobre as respostas em bovinos sugerem que os animais sofrem uma diminuição da resposta Th1, incluindo na produção de interferão gama (IFN γ) e reactividade linfocitaria na 4ª semana de infecção para se tornarem quase inexistentes a partir da 6ª semana (Clery, Torgerson & Mulcahy, 1996; Clery & Mulcahy, 1998; Bossaert, Jacquinet, Saunders,

Farnir & Losson, 2000). Estes resultados são semelhantes aos provenientes de estudos realizados em ratos, em que se verificou uma diminuição completa da resposta Th1 e o surgimento de citocinas Th2 (IL-4, IL-5) com uma magnitude dependente da carga parasitária (O'Neill *et al*, 2000). Estes resultados sugerem que *F. hepatica* consegue modular o sistema imunitário do hospedeiro de forma a evitar a sua detecção, lesão ou expulsão. Esta hipótese é apoiada pelos resultados provenientes de um modelo de co-infecção em ratos em que *F. hepatica* atrasa a remoção da bactéria e inibe a produção de IFN γ . Quando um rato é infectado ou vacinado com a bactéria *Bordetella pertussis*, ele monta uma resposta Th1 protectora, efectiva. No entanto se o rato estiver concomitantemente infectado com o tremátode, ele parece ser incapaz de formar uma resposta efectiva Th1 e não resiste à infecção bacteriana (Brady, O'Neill, Dalton & Mills, 1999)

Quando um animal é infectado por um parasita, a resposta do sistema imunitário desenvolve-se numa de duas direcções dependendo da natureza do parasita, ou seja, se é um protozoário intracelular ou um helminte. As infecções helmínticas são tipicamente controladas pelo que é descrito como uma resposta Tipo 2 de células T_{helper} (Th2). Esta resposta é caracterizada pelos isótopos dos anticorpos IgG1, citocinas como IL4, IL10 e outras que ajudam a recrutar eosinófilos e mastócitos a partir da medula óssea, que estão envolvidos na destruição e morte dos parasitas (Walsh, Brady, Finlay, Boon & Mills, 2009). *F. hepatica* desenvolveu vários mecanismos de evasão. Segrega enzimas capazes de clivar a ligação dos anticorpos à sua superfície e altera a sua superfície antigénica. Isto possibilita a sua migração através do parênquima hepático (Cancela *et al*, 2008) e mais tarde a sua sobrevivência num ambiente hostil (ductos biliares), uma vez que a interacção entre os produtos ES e o sistema imunitário ocorrem não só durante a migração larvar mas também nos ductos biliares. O aumento da quantidade das citocinas reguladoras fornecidas pelas células T_{reg} e Th2 pode diminuir a produção de IFN γ durante a progressão da doença, o que permite ao parasita migrar para um local mais seguro como os ductos biliares (Falcón *et al*, 2010). Os bovinos infectados pelo tremátode desenvolvem uma resposta específica de anticorpo, caracterizada pela presença de anticorpos IgG1. Estes são específicos a um leque de antígenos do parasita mas os principais antígenos imunodominantes são o grupo de proteinases catépsinas (Ortiz, Claxton, Clarkson, McGarry & Williams, 2000), segregado pelo parasita durante a sua migração através do fígado e pelos adultos nos ductos biliares para auxiliar na alimentação. Os bovinos infectados desenvolvem eosinofilia e nas fases mais avançadas da infecção uma resposta específica de proliferação celular. A presença das células T específicas ao parasita tem sido demonstrada no sangue periférico,

linfonodos mesentéricos e hepáticos de animais experimentalmente infectados (O'Neill *et al*, 2000). No entanto após cerca de 6 semanas pós infecção estas respostas celulares desaparecem. Além de que as citocinas interleucina 2 (IL2) e Interferão gama (IFN γ) que são detectáveis no início da infecção, também são suprimidas cerca de 6 semanas pós infecção. Estes resultados levam muitos investigadores a crer que os parasitas desviam activamente o sistema imunitário do hospedeiro para uma resposta Th2 a favor da sua sobrevivência e que contrariamente a resposta Th1 pode ser prejudicial para o parasita.

Apesar da criação de uma resposta imunitária adaptada, não há evidência da aquisição de resistência à reinfecção, nem nos bovinos nem nos ovinos. Os ruminantes parecem manter-se durante toda a vida, receptivos e sensíveis às infecções por *F. hepatica* (Clery *et al*, 1996).

Os dados experimentais obtidos no início da década de 1970 conduziram à ideia que os bovinos adquiriam imunidade a *F. hepatica*. Um trabalho na Faculdade de Medicina Veterinária de Glasgow, sugeriu que os bovinos poderiam adquirir algum grau de resistência a re-infecções por *Fasciola hepatica*. Bezerros foram infectados com metacercárias, tratados com um fármaco adequado 3 meses mais tarde e desafiados com uma segunda dose de metacercárias. No exame pós-mortem poucos foram os parasitas recolhidos nos fígados dos animais que tinham sido desafiados comparados com os do grupo controlo, que nunca tinham sido infectados. Estas experiências levam a crer que os bovinos podem adquirir algum grau de resistência ao parasita e que conseguem expelir uma carga parasitária de adultos (Doyle, 1972).

No entanto, estes achados não surgiram de observações de terreno. Os bovinos naturalmente expostos ao parasita são reinfectados repetidamente e estudos de intensidade/idade revelaram que não há evidência de que os animais mais velhos tenham cargas mais baixas, ou seja, não houve evidência que os bovinos adquirissem resistência com a idade (Ortiz *et al*, 2000). Além disso, quando os bovinos infectados naturalmente foram expostos a uma infecção experimental, foram igualmente susceptíveis como um grupo de bovinos não infectados, o que corrobora novamente a ideia de que os bovinos não adquirem imunidade protectora (Clery *et al*, 1996).

As respostas das células T_{helper} tipo 1 são normalmente vistas em animais infectados por agentes intracelulares como *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium bovis* e são caracterizadas por altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IFN γ , IL12, óxido nítrico, anticorpos IgG2 e activação via clássica dos macrófagos (Miller *et al*, 2009; Jacquiet, 2008).

A resposta imunitária específica Th2 pode mesmo ter efeitos nefastos sobre a resposta protectora aos agentes patológicos intracelulares como os protozoários (*Neospora caninum* ou *Toxoplasma gondii*) ou bactérias (micobactérias) que precisam da implementação de uma polarização Th1 (Jacquiet, 2008). Foi recentemente demonstrado que bezerros co-infectados com *Fasciola hepatica* e *Mycobacterium bovis* apresentaram respostas bem mais fracas na prova intradérmica de tuberculina relativamente aos bezerros não parasitados, o que levanta a questão se a infecção com este parasita pode comprometer a sensibilidade dos testes para o diagnóstico de tuberculose e possivelmente também influencia a susceptibilidade à tuberculose e a outras doenças bacterianas (Flynn, Mannion, Golden, Hacariz & Mulcahy, 2007)

Um estudo conduzido em bovinos infectados com *F. hepatica* revela que a coinfeção com *F. hepatica* e *Salmonella dublin* resulta num aumento de excreção de *S. dublin* e taxas de mortalidade mais elevadas (Aitken, Jones, Hall, Hughes & Collis, 1978).

Apesar de estudos mostrarem que *F. hepatica* suprime a activação clássica dos macrófagos e a resposta Th1 de ratos com infecções bacterianas, assim como a redução da sua capacidade de eliminação, foi demonstrado, num ensaio, que a forte resposta à infecção por *T. gondii* é capaz de suprimir a resposta Th2 associada com a infecção pré estabelecida de *F. hepatica* (Miller *et al*, 2009).

2.10.3 Sinais Clínicos

A fasciolose pode apresentar-se principalmente sob 2 formas clínicas, a aguda e a crónica.

2.10.3.1 Forma aguda

Pouco frequente em bovinos, está relacionada com a ingestão de grandes quantidades de metacercárias, que ao invadir o parênquima hepático provocam uma inflamação traumática (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999) em que os animais acabam por morrer após um período de depressão (VLA, 2010) ou evoluir mais lentamente de uma forma subaguda e nestes casos os animais podem apresentar hipertermia, depressão, inaptência, dores abdominais, perda de apetite, perda de condição corporal, atonia ruminal, icterícia, mucosas pálidas, ascite e alterações respiratórias (pneumonia secundária). A parasitose pode originar morte súbita (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999; SAC VS, 2007) devido à grande perda de sangue e à falha da função hepática, sem sintomatologia e nos casos de parasitismo intenso (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

2.10.3.2 Forma crónica

É a forma clínica mais frequente em bovinos. Os sinais mais característicos são a perda de peso, anorexia e mucosas pálidas ou ictéricas (Mitchell, 2002). Os animais afectados apresentam-se pouco activos e letárgicos. Pode estar presente constipação intestinal intensa durante a qual as fezes eliminadas são duras e quebradiças (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999) ou diarreia.

A forma crónica, no entanto, evolui com perda de condição corporal progressiva, inaptência, pêlo eriçado, seco, baço e quebradiço (figura 12) (Zimmerman, 1996), diminuição ou supressão da produção de leite, atraso no crescimento, diarreia (figura 13) que alterna com constipação, edemas submandibular (figura 12) (Pritchard *et al*, 2005; VLA, 2010) e abdominal, embora outros autores refiram que o edema submandibular e a ascite não são comuns e não há relatos de dor à palpação, nem hepatomegália (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). A perda de peso é um sinal muito característico e a diminuição do extracto seco do leite é muito importante uma vez que o fígado tem uma função activa na síntese da proteína do leite, da gordura e da lactose, sobre as quais a *F. hepatica* interfere no bom funcionamento (Heras, 1974).



Figura 12 - Pêlo baço e seco, edema submandibular, emaciação, prostração (original)



Figura 13 - Diarreia, fezes mucoides, esteatorreicas (original)

Muitas vezes, nos bovinos, a fasciolose pode ser agravada com estrongilídeos gastrointestinais, sendo a *Ostertagia ostertagi* um dos helmintes de maior relevância clínica (Mitchell, 2002).

2.10.4 Lesões

A destruição hepática devido a *Fasciola hepatica* é de dois tipos: lesões no parênquima provocadas pela migração dos parasitas jovens e lesões dos ductos biliares relacionadas com a presença de parasitas adultos (figura 14). A gravidade e duração da fase aguda e/ou crónica depende de alguns factores como a carga parasitária, a idade e a imunidade do hospedeiro. A migração das adolecercárias através do fígado provoca uma hepatite, cuja severidade depende do número de parasitas envolvido, assim como a duração da migração. A fasciolose aguda ou subaguda é mais comum em ovinos, quando as infecções são pesadas. Nos bovinos a forma crónica é a mais frequente.

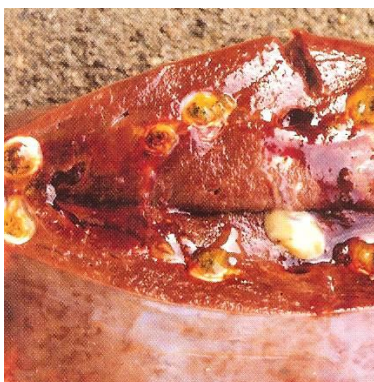


Figura 14 - Colangite e calcificação, estase biliar, inflamação e formação de abscesso (adaptado de http://lh3.ggpht.com/_D6qrwjAiFJo/R9qH2Shf8NI/AAAAAAAF-E/56cY2wlbyx8/1371.JPG)

2.10.4.1 Fasciolose aguda ou subaguda – Após a ingestão de metacercárias, os parasitas imaturos emergem do duodeno. Cerca de 24 horas após a ingestão, a maioria dos parasitas encontram-se na cavidade abdominal. Dentro de 2 semanas, a maioria penetra na cápsula e migra pelo parênquima hepático (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). Tipicamente, não há sinais visíveis da presença dos jovens parasitas (Jacquiet, 2008). No entanto, nos casos de infecções graves, pode haver uma peritonite exsudativa.

Quando um grande número de metacercárias é ingerido num curto espaço de tempo, os parasitas imaturos, especialmente com cerca de 4 a 6 semanas, originam uma ampla destruição do parênquima e deixam tractos hemorrágicos como resultado da sua migração. Dentro do fígado, os parasitas movem-se aleatoriamente antes de chegar aos ductos biliares, onde passam o resto do seu ciclo de vida. À medida que

migram pelo fígado, vão-se alimentando de tecido hepático. Os tractos migratórios são túneis tortuosos que surgem na superfície de corte como focos hemorrágicos com cerca de 2-3 mm de diâmetro. As espinhas localizadas no bordo ventral do parasita provocam irritação no tecido hepático que conduz à inflamação, destruição dos hepatócitos e fibrose. Além do mais, os parasitas secretam substâncias tóxicas que também provocam anemia, assim como necrose do parênquima. O fígado mostra tractos migratórios cheios de coágulos sanguíneos. O exame mais minucioso destes tractos revela uma porção anterior com parasitas imaturos, seguida de uma zona hemorrágica com uma porção posterior, que contém uma substância cinzento-avermelhada composta por infiltrados celulares primários (Stalker & Hayes, 2007).

Quando uma porção de fígado cortada é espremida na água, aparece um certo número de parasitas imaturos, cujo tamanho depende do tempo da infecção (a maioria mede entre 0,7 e 1,5 cm de comprimento). Quando o número de parasitas migrantes não é suficiente para causar doença aguda, a superfície do fígado é nodular, tem uma coloração castanho-escura e a serosa está espessada. Apesar de não estar presente uma hepatite acentuada associada à infecção aguda, os tractos migratórios ainda podem ser vistos. Parasitas jovens podem ser encontrados nos ductos biliares. Há colangite mas não tão extensa como nas formas crónicas. Nos bovinos, as formas sub-agudas frequentemente sobrepõe-se a uma infecção crónica pré-existente. Os tractos migratórios tornam-se difíceis de distinguir da cirrose periductal associada com a forma crónica.

2.10.4.2 Fasciolose crónica – esta é a forma que mais frequentemente se encontra nos bovinos. O exame pós morte revela cirrose que pode ser generalizada. O parênquima é fibroso e firme, os ductos biliares principais proeminentes (figura 15), espessados, fibrosos e calcificados. À incisão, contém um número variável de parasitas adultos, que por vezes não é proporcional à extensão das lesões (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). A migração dos parasitas imaturos conduz à formação de trombos nas veias hepáticas e sinusóides (Tanimoto, Shirota, Ohtsuki & Araki, 1998), acompanhados de necrose isquémica do parênquima. Quando ocorre regeneração destas lesões há deposição de colagénio dando origem a fibrose (figura 15). Este tecido de cicatrização leva a uma alteração considerável da estrutura hepática. Os tecidos fibrosos estabelecem pontes entre os tractos migratórios e o tecido normal, o que provoca a subdivisão do parênquima hepático em lóbulos irregulares. Desenvolve-se fibrose perivascular em torno de hepatócitos individuais ou grupos de hepatócitos, bem como fibrose nodular. A fibrose monolobular contribui para a regeneração da estrutura hepática, contrabalançando assim a deformação produzida

por outros processos fibrinosos. Estas lesões são mais acentuadas no lobo ventral do fígado, onde a migração parasitária máxima ocorre (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). O tecido fibroso também é depositado no espaço porta. As veias ficam parcialmente obstruídas pela pressão exercida pelo edema e pela acumulação celular. A reacção perivascular inflamatória e a formação de tecido fibroso podem agravar as lesões. A obstrução do fluxo sanguíneo na veia porta leva ao aumento compensatório de fluxo sanguíneo na artéria hepática. O aumento resultante na pressão sanguínea intrahepática conduz à fibrose perisinusoidal compensatória. As artérias hepáticas também ficam espessadas e tortuosas. A colangite (figura 17) é devida à presença de parasitas adultos nos ductos biliares: o epitélio torna-se hiperplástico nas proximidades e à distância de *F. hepatica*, e muitos eosinófilos bem como células mononucleares infiltram-se na lâmina própria (Tanimoto *et al*, 1998). As espinhas e as ventosas do parasita danificam o epitélio dos ductos biliares e a indução da reacção inflamatória provoca fibrose na lâmina própria dos ductos biliares (figura 17) e do tecido adjacente. Os movimentos do parasita dentro dos ductos biliares exacerbam estas lesões (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). A calcificação das paredes dos ductos biliares é frequentemente verificada em associação com colelitíase conduzindo à formação de cálculos completos (Corêa, 1976), provoca relevo visível na superfície hepática e o corte do tecido com uma faca torna-se difícil. A mucosa biliar hiperplásica torna-se permeável às proteínas plasmáticas, em particular à albumina. Este fenómeno, combinado com a actividade hematofágica dos parasitas adultos, justifica a hipoalbuminemia durante a infecção (Lee *et al*, 1992). Foi também observada colecistite hiperplásica na vesícula biliar de bovinos infectados com *F. hepatica* (Jones, Hunt & King, 1997).

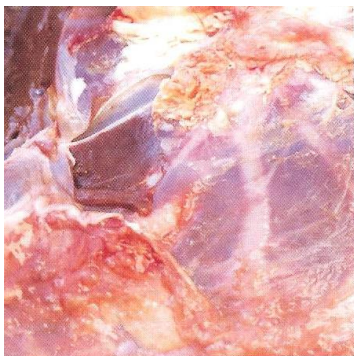


Figura 15 - Fibrose hepática e colangite (original, matadouro de Tomar)

Os parasitas por vezes são encontrados noutros órgãos, como os pulmões. As lesões nos pulmões consistem em nódulos sub pleurais nas porções periféricas do pulmão. O seu diâmetro varia de aproximadamente 1 a vários cm e consistem em abscessos

finamente encapsulados com conteúdo gelatinoso, purulento e acastanhado. O parasita morto ou vivo permanece nos detritos, é pequeno e difícil de encontrar (Stalker & Hayes, 2007).

2.10.4.3 Peritonite

Quando as infecções são maciças e repetidas, pode surgir peritonite provocada pelos jovens parasitas a caminho do fígado ou por ruptura da cápsula do fígado. A peritonite pode ser aguda e exsudativa ou crônica e proliferativa. Frequentemente fica limitada na cápsula, principalmente na superfície visceral ou pode estar restrita ao peritoneu parietal. Em casos agudos há depósitos fibrinohemorrágicos nas superfícies serosas e nos casos crônicos pode verificar-se placas de fibrina com adesões ou um espessamento mais ou menos difuso do tecido conjuntivo. Alguns parasitas podem ser encontrados microscopicamente nos depósitos fibrinosos e nos espessamentos peritoneais difusos encontram-se túneis de migração contendo sangue, detritos e parasitas jovens. Nos casos em que há envolvimento do peritoneu visceral, podem ser encontrados parasitas nos linfonodos mesentéricos que se encontram aumentados (Stalker & Hayes, 2007).

2.10.4.4 Cronologia das lesões

A não ser que a infecção seja grave, os primeiros dias de invasão do parênquima hepático pelas adolelescercarias não resulta em alterações patológicas significativas. Nesta fase, a ventosa oral das formas parasitárias imaturas morde profundamente, beliscando a massa hepática, mas a extensão da lesão depende do tamanho do parasita. À medida que o tamanho dos parasitas vai aumentando, perdem-se maiores quantidades de sangue a partir dos sinusóides danificados, até que o fígado se torna hemorrágico 2 semanas após infecção podendo ser encontrados no fígado os trajectos necrosados que medem aproximadamente 1 mm de diâmetro. No fim destes trajectos podem observar-se detritos celulares, leucócitos e eritrócitos. Os hepatocitos adjacentes estão atrofiados com núcleos picnóticos e os sinusóides distendidos com células mononucleares, linfócitos e granulócitos. Três a sete semanas pós-infecção é comum surgir no parênquima as zonas necróticas que podem ser vistas junto dos parasitas jovens e uma infiltração acentuada com células reactivas, estando também presentes enfartes de várias dimensões (figura 16).

As alterações histopatológicas nos ductos biliares durante as fases iniciais da infecção ocorrem muito antes de os parasitas os penetrarem. Os processos inflamatórios iniciam-se com uma fase aguda caracterizada pela hiperplasia do epitélio dos ductos biliares que aumenta entre os dias 30 e 40, quando os parasitas penetram nos ductos.

O processo inflamatório torna-se crônico rapidamente com fibrose, eosinofilia, infiltração linfocitária e presença de mastócitos e macrófagos (Lee *et al*, 1992). Ao longo do tempo, há deposição de cálcio o que conduz à formação de incrustações mais ou menos visíveis. O processo inflamatório crônico estende-se até à periferia e leva à esclerose do parênquima adjacente. A fibrose é mais ampla na porção visceral no lado esquerdo do fígado, onde ocorre a maior parte da migração, enquanto o lobo direito mostra sinais visíveis de hipertrofia compensatória (Stalker & Hayes, 2007). O espessamento das paredes dos ductos biliares e a presença de depósitos de cálcio dificultam a sobrevivência dos parasitas para além de um ano, nesta espécie (Taylor & Andrews, 1992).

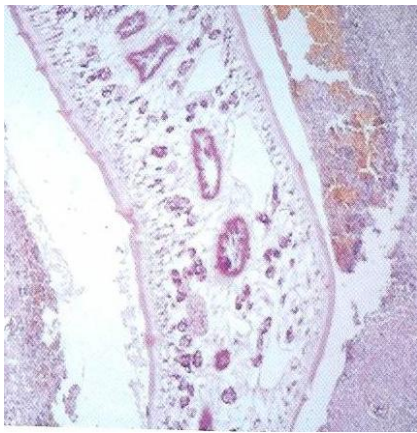


Figura 16 - Jovem parasita em migração no parênquima hepático: infiltração celular, hemorragia e células hepáticas em necrose junto ao parasita
(http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/img_galeria/TREMA/imagens/fhep_cbiliar1.jpg.jpg)



Figura 15 - Colangite e perihepatite fibrosa (original, matadouro de Tomar)

2.10.5 Relação Hospedeiro/Parasita

Consoante a espécie de hospedeiro definitivo há uma variação considerável na susceptibilidade à infecção e nas respostas imunes contra o parasita. É sugerido que estas variações no sistema imunitário do hospedeiro resultem de várias pressões

selectivas, sendo esta hipótese apoiada por factos como a morfologia dos parasitas adultos e ovos que varia consoante o hospedeiro; a glutathione-S-transferase apresenta uma maior variabilidade em parasitas de bovinos do que nos parasitas de ovinos; a composição iónica dos parasitas que infectam os bovinos é diferente dos que parasitam os ovinos; o sucesso de infecções experimentais de caracóis é marcadamente diferente entre miracídios obtidos de diferentes hospedeiros definitivos (Hurtrez-Boussès *et al*, 2001).

Pensa-se que os mecanismos subjacentes à diferença de susceptibilidade dos hospedeiros à infecção por *F. hepatica*, estão relacionados com diferenças na fibrose do fígado, com a extensão à qual a migração através do parênquima hepático pode ser atrasada e pela extensão da resposta inflamatória do hospedeiro. Portanto a susceptibilidade/resistência do hospedeiro parece estar relacionada com diferenças inatas em vez de parâmetros imunes. No entanto, há ainda diferenças de susceptibilidade dos hospedeiros que estão pouco esclarecidas (Valero, Darce, Panova & Mas-Coma, 2001).

Citando Conceição (2001), Boray (1969) avaliou vários hospedeiros relativamente à resistência à infecção por *F. hepatica* e afirma que as diferenças de resistência verificadas em diferentes espécies animais estão relacionadas com a quantidade de tecido hepático envolvido, juntamente com a quantidade de perda de sangue devido ao traumatismo. Revela ainda que algumas espécies como o porco eliminam as formas jovens durante a migração hepática que dá origem a infecções reduzidas e sem grandes prejuízos para o hospedeiro. No caso dos bovinos, afirma que estes apresentam uma resistência retardada, na última fase de migração, justificada pela colangite com hipertrofia e deposição de sais de cálcio o que impede a alimentação do parasita com consequente eliminação do mesmo. Por último, espécies como os ovinos não produzem reacção suficiente para dificultar a sobrevivência do parasita, apresentando assim baixa resistência à infecção. Nestes animais os parasitas podem sobreviver indefinidamente.

2.10.6 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico deve basear-se na sintomatologia, na ocorrência sazonal, nos tipos de clima prevalentes e na história prévia de fasciolose na exploração ou de identificação de habitats de caracóis (Urquhart *et al*, 1996). Durante a procura de sinais clínicos na exploração, apesar de não serem sinais patognomónicos e serem bastante aleatórios (Jacquiet, 2008), devem ser suficientemente expressivos para que o veterinário possa diagnosticar a doença (Heras, 1974).

O mais frequente é a forma crónica da doença. Pode observar-se emaciação, depressão, anorexia, perda de peso, desidratação, icterícia (figura 18), edema e/ou ascite, palidez das mucosas, pêlo seco e quebradiço, constipação ou diarreia (VLA, 2010), distúrbios digestivos vagos (Mehlhorn, 2001) e morte (Zimmerman, 1996) em condições de intenso parasitismo, especialmente em vitelos (Urquhart *et al*, 1996; Pritchard *et al*, 2005; SAC VS, 2007,).



Figura 16 - Mucosas ictericas (original) Figura 17 - Fezes mucoides (original)

Em bovinos a infecção por *F. hepatica* manifesta-se muitas vezes de uma forma subclínica que é frequentemente ignorada devido à falta de sinais clínicos mas com alterações dos parâmetros produtivos quer na produção de carne, quer na produção de leite (Schweizer, Braun, Deplazes & Torgerson, 2005). Pode haver um efeito substancial na produção do leite como a sua diminuição e redução das fracções sólidas (gordura, proteína) (Charlier, Duchateau, Claerebout, Williams & Vercruysse, 2007) enquanto que na carne se verificam reduções na eficácia de conversão alimentar com redução do ganho médio diário (Chick, Coverdale & Jackson, 1980; Genicot, Mouligneu & Lekeux, 1991)

Numa exploração onde existem habitats para os caracóis é provável que haja fasciolose no efectivo, o que torna o hospedeiro intermediário como um bom elemento para suspeita. O reconhecimento das espécies *L. truncatula* é relativamente fácil: trata-se de um molusco com forma em espiral orientada para a direita (quando o ápex está a apontar para o céu, a abertura da concha é à direita) e de pequeno tamanho (de alguns mm a 1 cm). As voltas da espiral são muito acentuadas e em escada. O tamanho da abertura da concha não ultrapassa metade da altura total da concha (Jacquiet, 2008).

A fasciolose bovina é frequentemente associada com estrongilidose gastrointestinal, o que torna o reconhecimento clínico ainda mais incerto (Loyacano *et al*, 2001).

O reconhecimento dos habitats dos caracóis e acima de tudo, os exames laboratoriais vão confirmar a presença deste parasita que pode permanecer clinicamente silencioso, mas economicamente dispendioso (Schweizer *et al*, 2005).

2.10.7 Diagnóstico laboratorial

A hipoproteinemia moderada com hipoalbuminemia e aumento dos níveis das imonoglobulinas, assim como a anemia e a eosinofilia são indicadores secundários não específicos. No entanto, estes sinais são bastante sugestivos em caso de uma forte suspeita clínica e justificam que se realize um diagnóstico específico de fasciolose, em particular se os biótopos favoráveis à *L. truncatula* estiverem presentes na exploração (Jacquiet, 2008).

Pode verificar-se leucocitose e esta está relacionada com mecanismos inflamatórios e imunitários associados à presença da *Fasciola hepatica*. A eosinofilia pode sugerir a presença de uma infecção provocada por um helminte, mas a ausência de eosinofilia não pode excluir a presença destes parasitas (Şimşek *et al*, 2006). Os bovinos infectados apresentam eosinofilia (os eosinófilos podem representar até 20% dos leucócitos) (Jacquiet, 2008). Estudos realizados em ovelhas revelam a existência de 2 picos de eosinofilia durante a infecção, sendo o primeiro às 5 semanas e o segundo às 13 semanas (Mekroud, Chauvin & Rondelaud, 2007).

As globulinas alfa e beta são proteínas indicadoras de inflamação e encontram-se algumas vezes aumentadas (Jain, 1993). As gamaglobulinas são particularmente indicadoras de reacção imunitária relacionada com a infecção parasitária com a produção de imunoglobulinas específicas (IgG, IgM) que são parcialmente protectoras e os seus valores aumentam logo nas primeiras semanas de infecção (Ortiz *et al* 2000). Durante a diminuição da síntese de albumina há aumento da perda desta, enquanto que o nível de globulinas (principalmente IgG) está elevado, resultando na diminuição do quociente albumina/globulina (Zimmerman, 1996). O valor da albumina não representa mais que 30% das proteínas totais do sangue, ao contrário de 50% em animais sãos (Jacquiet, 2008). No entanto, há autores que afirmam que a albumina plasmática e a concentração de proteínas totais não têm valor no diagnóstico de fasciolose (Wyckoff & Bradley, 1985).

A anemia está relacionada com a hematofagia dos parasitas adultos, ocorre progressivamente e é fracamente regenerativa. A hemoglobinemia é baixa e muitas vezes associada com hipocromia e hiposidremia (Lotfollahzadeh, Mohri, Bahadori, Dezfouly & Tajik, 2008). A eritropoiese ferropénica conduz ao desenvolvimento de microcitose e hipocromia, uma consequência da diminuição da síntese de hemoglobina pela falta de ferro. Os resultados de um estudo realizado em ratos

sugerem que o tipo de anemia na fasciolose pode ser considerado como um biomarcador do período de cronicidade da doença alterando de normocítica para macrocítica no período crónico inicial e para microcítica num período crónico avançado. Da mesma forma, mudando de normocrómica para hipocrómica numa fase avançada (Valero *et al*, 2008).

A determinação da actividade plasmática de algumas enzimas de origem hepática tem demonstrado ser muito útil no estudo e diagnóstico de hepatopatias em medicina veterinária. O valor destas enzimas depende da sua sensibilidade, especificidade e estabilidade no plasma (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). O aumento dos valores da actividade de GLDH e GGT fornecem indicações sensíveis de lesão hepática, sendo estas relativamente específicas deste órgão e estáveis a variações de temperatura, acabam por ser os melhores marcadores enzimáticos para o diagnóstico de fasciolose (Anderson *et al*, 1977). Na ausência de outros dados, o aumento da actividade plasmática da GLDH ou da GGT indicam fasciolose aguda e subaguda ou crónica, respectivamente (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). A sua concentração aumenta entre as 8 e as 12 semanas pós infecção e diminui entre as 12 e as 20 semanas pós infecção (Gaasenbeek, Moll, Cornelissen, Vellema & Borgsteede, 2001).

Outro parâmetro que pode estar alterado em infecções por *F. hepatica* é a concentração de bilirrubina sérica. Quando se verifica colestase associada à obstrução do fluxo biliar os valores de bilirrubina estão aumentados, o que se pode verificar segundo alguns autores entre as 6 e as 14 semanas (Mekroud *et al*, 2007).

2.10.8 Achados de necrópsia

O exame pós-morte no matadouro é o melhor meio para identificar *Fasciola hepatica*. As lesões de fasciolose no fígado são a prova da presença do parasita na exploração.

O exame dos fígados é sistemático em matadouro. A presença de lesões de colangite e das fasciolas adultas é uma prova irrefutável do estado infestado da exploração. A este método falta sensibilidade em casos de infecção moderada ou infecções muito precoces. Cerca de um terço das infecções não são assinaladas no matadouro e o retorno da informação ao produtor não costuma ser assegurado (Rapsch *et al*, 2006).

Os achados de necrópsia dependem da idade do animal, da carga parasitária, da duração da infecção, do estado nutricional e imunológico prévios do animal e do grau de compensação.

Algumas observações incluem pelo áspero, emaciação do cadáver em casos crónicos, edema, ascite, icterícia, desidratação, descargas sanguinolentas (nasal e anal),

diminuição da gordura corporal, hemorragia no fígado. Podem ser observados trajectos migratórios (1-4 mm a vários cm) (Zimmerman, 1996) e focos necróticos na superfície hepática (Tanimoto et al, 1998). O parênquima hepático bem como os ductos biliares hiperplásicos podem tornar-se fibrosos ou mesmo calcificados em infecções crónicas. Nos bovinos é característico o espessamento e calcificação dos ductos biliares (figura 20). A vesícula biliar está muitas vezes distendida com bÍlis mucóide (Zimmerman, 1996). Em casos agudos o fígado pode encontrar-se hipertrofiado e hemorrágico. Podem ser encontrados parasitas de 1-7 mm de comprimento no parênquima hepático e inclusivamente no peritoneu, baço, pâncreas e pulmões. Apesar das lesões principais se centrarem no fígado, também se podem verificar alterações nos gânglios periportais, por vezes nos mesentéricos e no peritoneu. Os linfonodos surgem aumentados de tamanho (até 4-5 vezes) e ao corte apresentam coloração castanha-esverdeada (figura 21). No peritoneu, segundo a evolução da parasitose, a inflamação pode ser proliferativa – forma crónica ou exsudativa – forma aguda. Em alguns casos observam-se processos inflamatórios fibrinonodulares cinzentos ou cinzento-avermelhado, em ambas as camadas peritoniais (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).



Figura 18 - Hiperplasia e calcificação dos ductos biliares (original, matadouro de Tomar)



Figura 19 - Aumento dos linfonodos hepáticos (original, matadouro de Tomar)

2.10.9 Diagnóstico coprológico

A maioria dos autores considera o exame fecal como o diagnóstico ante-mortem mais utilizado que confirma a presença de parasitas adultos nos ductos biliares. No entanto, nos bovinos, os ovos são eliminados irregularmente e em pequeno número. Assim o número de ovos nas fezes não é directamente proporcional à carga parasitária. A detecção de um só ovo num único animal numa exploração ou num grupo deve ser considerado como uma prova de infecção do rebanho e deve conduzir ao tratamento de toda a exploração ou grupo de origem o mais rapidamente possível (Jacquiet, 2008).

No entanto, as técnicas coprológicas não permitem detectar:

- Infecções na fase pré patente, ou seja, durante a migração dos parasitas através do parênquima hepático;
- Infecções com baixa intensidade, uma vez que a eliminação é escassa e a postura pode ser irregular e passar despercebida.

Deste modo os resultados negativos de exames coprológicos individuais não permitem excluir a infecção por *F. hepatica*, mesmo que sejam realizados numa dezena de indivíduos do efectivo (Happich & Boray, 1969). Os métodos coprológicos só detectam ovos nas fezes a partir da 10^a-11^a semanas pós infecção, além disso têm uma baixa sensibilidade (30%), o que pode dar origem a falsos negativos (Şimşek, Köroğlu, Ütük & Altay, 2006).

2.10.9.1 Características da eliminação de ovos de *F. hepatica*

A excreção dos ovos de *F. hepatica* varia ao longo do dia, entre dias e a distribuição dos ovos pelas fezes é irregular, portanto os exames fecais únicos podem conduzir a conclusões incorrectas (Kassai, 1999).

A chegada dos ovos ao intestino, através do ducto colédoco não é uniforme nem proporcional ao número de parasitas existentes. Em infestações maiores há lesões mais extensas e é na vesícula biliar que há maior acumulação de ovos. Como, na vesícula, em infecções graves existem secreções muco-purulentas, muco-membranosas, muco-hemorrágicas ou várias ao mesmo tempo, misturadas com detritos e como o fluxo da vesícula biliar não está normal, mas sim lento devido à acção dos parasitas, facilmente se compreende que o número de ovos que pode chegar ao intestino, está dependente da intensidade das contracções vesiculares. Logo, uma menor carga parasitária origina maior facilidade de evacuação vesicular que corresponde a um maior número de ovos nas fezes. Os animais com menos lesões têm maior quantidade de ovos nas fezes e vice-versa.

A idade dos hospedeiros também influencia, na medida em que o número de ovos expulsos é tanto menor quanto mais velhos são.

Dorsmann em 1960 estudou o ritmo de expulsão de ovos ao longo do dia em bovinos e observou uma variação considerável na saída dos ovos, dependendo do tipo de vida dos animais, tipo de alimento consumido e principalmente a hora do dia em que fazia as determinações. Verificou a eliminação de ovos entre as 8,30 e as 16.30, com um pico entre as 12.30 e as 14.30.

Em 1972 Bogatko, que trabalhou com fezes de bovino verificou que a expulsão de ovos é mais baixa no Verão do que nas outras estações do ano e que durante as horas da tarde o número de ovos é 2,5 vezes superior ao dos da manhã.

Boray também verificou que a idade e o grau de maturidade sexual do parasita tinham influência no número de ovos excretados, com tendência para aumentar até à 21ª semana, com um número máximo de 21,5 ovos por grama de fezes e diminuir a partir desta.

Foram ainda realizados estudos para obter a relação entre o número de parasitas e o número de ovos encontrados por grama de fezes, verificando de seguida o número de ovos que corresponde a uma fasciola nesse mesmo grama de fezes. O estudo foi realizado em 2 animais que foram sacrificados no matadouro e obtiveram 13,58 e 16 ovos por grama de fezes.

Desta forma se pode ver a dificuldade de encontrar ovos nas fezes. Há autores que referem ser boa prática a administração de um laxante ou de um colagogo ou ambos de forma a facilitar a saída de ovos em maior número (Heras, 1974).

2.10.9.2 Recolha de amostras fecais

A recolha das amostras deve ser feita directamente do recto, para evitar contaminações com outros ovos ou uma possível evolução embrionária se as

condições ambientais forem favoráveis. Podem-se colher fezes de bovino do solo se forem emitidas na altura, seleccionando a parte central e um pouco profunda. No que diz respeito à hora, segundo os estudos realizados, é aconselhada às primeiras horas da tarde. A quantidade de amostra a recolher no caso dos bovinos é à volta de 500g. Quando as fezes não são processadas de imediato é necessário conservar à temperatura de refrigeração ou em solução de formol a 10%. As fezes devem estar sempre bem acondicionadas, os sacos bem fechados e com identificação (Heras, 1974).

2.10.9.3 Técnicas

Os ovos de *F. hepatica* são pesados e densos, portanto não flutuam em água e requerem ou líquidos de elevada densidade para técnicas de flutuação ou a utilização de técnicas de sedimentação.

Os métodos de flutuação utilizam soluções de elevada densidade como o sulfato de zinco e o iodeto de mercúrio. Os riscos potenciais associados ao mercúrio têm vindo a conduzir a uma utilização cada vez menos frequente destas soluções apesar da sua segurança/confiança e facilidade de examinação. Soluções muito concentradas de sulfato de zinco têm o inconveniente de por vezes deformar os ovos e estes colapsarem devido a fenómenos osmóticos, o que pode tornar difícil a sua identificação. A flutuação com sulfato de zinco é uma técnica muito difundida, mas ineficaz frente a um baixo número de ovos eliminados, recomendando-se então, os métodos de sedimentação (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

Os métodos de sedimentação baseiam-se na maior densidade dos ovos de tremátodes, o que permite concentrá-los no sedimento. As técnicas de sedimentação utilizando água (técnica de Boray) são seguras e permitem detecção a níveis de um ovo por grama de fezes. Estes são os métodos preferidos, utilizados pelos investigadores britânicos, que achavam os testes bastante satisfatórios (Happish & Boray, 1969). A adição de um corante de contraste ao sedimento, como o azul-de-metileno, permite destacar a cor amarela dourada dos ovos (Zimmerman, 1996).

A sensibilidade do exame fecal pelos métodos de flutuação em líquido denso ou sedimentação podem ser significativamente melhorados através da utilização de métodos de filtração (crivagem) e/ou centrifugação associada.

Deve ter-se muito cuidado para diferenciar os ovos de *F. hepatica* dos de *Paramphistomum* spp., que são ligeiramente maiores e de cor mais clara (figuras 22 e 23) (Jacquiet, 2008).



Figura 20 - Ovo de *F. hepatica* (adaptado de http://www.rvc.ac.uk/review/parasitology/images/largeLabelled/Fasciola-hepatica-egg-_p-5.jpg)

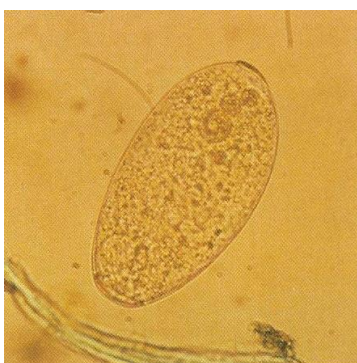


Figura 21 - Ovo de *Paramphistomum* spp. (adaptado de http://www.rvc.ac.uk/review/parasitology/images/largeLabelled/Paramphistomum-cervi-egg-_-.jpg)

Segundo Conceição (2001), as técnicas mais utilizadas para o diagnóstico de fasciolose bovina são: sedimentação simples (anexo 1), método de Ritchie, 4 crivos de Girão e Ureno e a Flukfinder.

2.10.10 Diagnóstico Serológico

A monitorização da fasciolose por imunodiagnóstico pode ser feita através de testes ELISA, hemaglutinação e imunofluorescência indirecta.

Os testes ELISA são os mais utilizados pela maioria dos investigadores e são seguros, baratos e de fácil procedimento (Dorchies, 2006). A serologia individual é melhor do que os testes feitos em “pool” que perdem sensibilidade devido à diluição (níveis baixos de anticorpos individuais são consistentes com infecção recente ou um pequeno número de parasitas). Resultados positivos ao teste de todos ou alguns dos animais de um grupo é um sinal de exposição ao parasita (Chauvin, Moreau & Boulard, 1997).

2.10.10.1 Detecção de anticorpos no sangue

Actualmente é a técnica mais utilizada e são preparados de acordo com protocolo normalizado com antígenos (enzimas digestivas, proteínas de superfície) de parasitas cultivados *in vitro* sob diferentes condições ambientais, como o antígeno somático f2 purificado (Kit Pourquier, Montpellier, França), antígenos ES em bruto ou sob a forma de fracções purificadas/recombinantes. Uma das fracções antigénicas mais activas consiste na proteinase catepsina L1 das células do epitélio intestinal, que como já foi referido cliva imunoglobulinas e inibe a acção dos eosinófilos sobre os jovens parasitas. (Cornelissen *et al*, 2001; Dorchies, 2006).

Esta técnica de diagnóstico representa uma contribuição importante na detecção precoce da infecção por *F. hepática*. Detecta infecções 4 a 5 semanas mais cedo relativamente aos métodos coprológicos. Graças ao ELISA os anticorpos são detectados desde a 4ª semana pós infecção experimental (Reichel, 2002) e persistem 2-6 meses depois do tratamento (Şimşek *et al*, 2006). Arias *et al* (2006) refere que o aumento dos níveis de anticorpos pode ser verificado logo na 1ª semana com a utilização de uma fracção proteica recombinante. Estes testes permitem uma boa discriminação entre soros positivos e negativos, têm-se revelado testes rápidos e (Şimşek *et al*, 2006) com elevada sensibilidade e especificidade. Dando o exemplo de 95% de sensibilidade e 98,2% de especificidade para f2-ELISA (Reichel, Vanhoff & Baxter, 2005), 98% e 96% para ES-ELISA (Salimi-Bejestani *et al*, 2005).

A intensidade de resposta de anticorpos é difícil de relacionar com a intensidade das infecções, para a maior parte dos autores esta relação não pode ser estabelecida (Charlier, Duchateau, Claerebout, Williams & Vercruysse, 2007). Para outros, pelo contrário, uma distinção entre a intensidade alta e baixa da infecção é possível através da medição do título de anticorpos no teste ELISA. No entanto, faltam dados para saber se este modo indirecto de avaliação de intensidade pode ser utilizado em condições naturais (Salimi-Bejestani, Cripps & Williams, 2008).

A desvantagem destes testes serológicos é que resultados positivos apenas significam que houve exposição ao parasita numa determinada altura, mas não necessariamente infecção decorrente (Yildirim *et al*, 2007), simultaneamente a persistência de anticorpos circulantes permanece por muito tempo (4-6 meses) após o tratamento, o que os torna inadequados para a avaliação do sucesso do anti-helmintico. Há ainda a considerar a variação da resposta dos anticorpos à *F. hepática* ao longo da infecção (Castro, Freyre & Hernández, 2000).

2.10.10.2 Detecção de anticorpos no leite do tanque de ordenha

Em vacas de leite, os testes ELISA em amostras do tanque de ordenha permitem uma monitorização rápida e relativamente barata dentro dos efectivos. No entanto verifica-se uma marcada diminuição na sensibilidade, nos ensaios realizados por Reichel *et al* (2005), utilizando o antígeno f2, a infecção só é detectável por este método quando a prevalência no efectivo excede os 60%. Um outro estudo realizado por Salimi-Bejestani *et al* (2005) para avaliar a prevalência de *F. hepatica* em vacarias leiteiras com este teste concluiu que com uma prevalência de infecção de 25%, o f2-ELISA revelou uma sensibilidade e especificidade de 96% e 80%, respectivamente.

2.10.10.3 Detecção de antígenos no sangue

Os testes baseados em antígenos realizados no soro ou nas fezes podem evitar os inconvenientes associados à presença de anticorpos por longos períodos após o tratamento. Os níveis de antígenos no soro podem ser detectados a partir do 6º dia pós infecção e assim estes testes podem ser muito úteis no diagnóstico precoce da fasciolose no período pré-patente (Leclipteux *et al*, 1998). Foi também demonstrado que um ELISA sandwich baseado num anticorpo monoclonal (ES 78), é um método sensível, específico e adequado para a detecção de *F. hepatica* no soro e fezes de animais e humanos com fasciolose activa (Duménigo & Mezo, 1999).

Apesar da detecção de antígenos circulantes ser aparentemente melhor que os anticorpos para o diagnóstico precoce de fasciolose, a sua utilidade é limitada após 7 semanas de infecção, provavelmente devido à formação de imunocomplexos. (Castro *et al*, 2000).

2.10.10.4 Detecção de antígenos nas fezes

Foi desenvolvido um teste que põe em evidência copro antígenos para a fasciolose ovina e bovina. O seu princípio é detectar antígenos ES de *F. hepatica*, nas matérias fecais de um animal infectado por parasitas localizados dentro dos canais biliares, com a ajuda de um anticorpo monoclonal específico (MM3). O teste detectou 100% das ovelhas em estudo com 1 parasita, 100% dos bovinos com 2 parasitas. Os autores afirmam que a concentração dos coproantígenos está directamente relacionada com a carga parasitária e varia inversamente ao longo do tempo após a infecção. Mesmo em animais com baixa carga parasitária (1-36 parasitas) a primeira detecção de coproantígenos através deste método, ocorreu 1-5 semanas antes da detecção por coprologia (Mezo, González-Warleta, Carro & Ubeira, 2004).

Foi utilizado na Bélgica, em investigações epidemiológicas para comparação com outros métodos. Na Bélgica a sensibilidade e especificidade do teste foram

respectivamente 94 e 93% (Charlier, Meulemeester, Claerebout, Williams & Vercruysse, 2008). Antes de preconizar o emprego deste teste é necessário um trabalho de validação suplementar (Jacquiet, 2008).

Os potenciais benefícios do método para o diagnóstico têm sido monitorizados por Torgeson e Deplazes (2005). Estes autores compararam quatro métodos: exame fecal, procura de ovos na vesícula biliar, anticorpos ELISA e inspecção de rotina no matadouro em 1087 bovinos, para os quais a prevalência global foi de 18,2%. As sensibilidades dos diferentes métodos foram 69,6% para a coprologia, 93,7% para a procura de ovos na vesícula biliar, 88,2% para Ac-ELISA e 64% para inspecção de rotina em matadouro pelos serviços oficiais.

2.10.11 Tratamento

Os fasciolicidas pertencem a quatro famílias químicas: fenóis halogenados (nitroxinil), salicilanilidas (closantel e oxiclozanida), as sulfonamidas (clorsulon) e os benzimidazóis (triclabendazol, albendazol e netobimina, esta última precursor de outra molécula após metabolização, o albendazol, esta sim com actividade anti-parasitária). Apenas três moléculas têm uma actividade adulticida e larvicida ao mesmo tempo (nitroxinil, closantel e triclabendazol), as outras têm uma actividade meramente adulticida.

A escolha do fármaco depende do tipo de produção, vacas em lactação, vacas secas, vacas de carne. Além disso, o alvo também deve ser considerado, ou seja, parasitas adultos ou larvas em diferentes estádios. A documentação legal especifica se o produto é um adulticida (afectando só os parasitas adultos localizados nos ductos biliares e portanto com idades de 8-10 semanas ou mais velhos) ou larvicida (afectando apenas adolelescercárias ou larvas em migração pelo parênquima hepático tão cedo como na 6ª semana) ou efectiva contra todos os estádios do parasita, logo na segunda semana.

Quadro 1 – Fasciolicidas (Adaptado de Apifarma, 2007)

Grupo	Princípio Activo	Nome Comercial	Via	Dose	I.S. (dias)	
					Leite	Carne
Benzimidazóis	Triclabendazol	Fasinex 10%**	Oral	12 mg/Kg	X	28
	Albendazol	Albendavet 10%	Oral	10 mg/Kg (0.4mL/Kg)	4	14
		Valben 2.5%	Oral	10 mg/Kg (0.4mL/Kg)	3	12
	Netobimina	Hapasil 15%**	Oral			
Sulfonamidas	Clorsulon*	Ivomec F	Subcutânea	2 mg/Kg (1mL/50Kg)	X	28
Fenóis	Nitroxinil	Dovenix	Subcutânea	10 mg/Kg (1mL/25Kg)	X	60
Halogenados	Closantel	Flukiver	Subcutânea	5 mg/Kg (1mL/10Kg)	X	28
Salicilanilidas	Oxiclozanida**					

I.S. – Intervalo de Segurança

X – proibida a administração a animais produtores de leite para consumo humano

*em associação com ivermectina

**não é comercializado em Portugal

2.10.11.1 Fenóis Halogenados

Entre os mecanismos de acção deste grupo estão descritos a inibição de duas enzimas chave da via respiratória (malato desidrogenase, succino desidrogenase) e inibição da fosforilação oxidativa. O principal mecanismo de acção pode estar relacionado com alterações na permeabilidade a certos iões da membrana muscular que em menos de 3 horas provocam paralisia espástica no parasita. São visíveis lesões vacuolares na cutícula após a administração de alguns compostos deste grupo e ruptura do sistema reprodutivo em 4 horas. O nitroxinil está disponível no mercado com o nome Dovenix® e administrado via subcutânea na dose de 10 mg/Kg, é bastante activo contra parasitas adultos e mostra boa actividade, embora irregular contra parasitas entre as 6 e 8 semanas de idade.

2.10.11.2 Salicilanilidas

Interferem na fosforilação oxidativa o que conduz a alterações metabólicas como estimulação do consumo de oxigénio, aumento de absorção de glucose, diminuição das reservas de glicogénio, alterações no rácio oxaloacetato/malato e diminuição da síntese de ATP.

Não foi observada diminuição dos níveis de ATP após o tratamento com oxiclozanida, o que leva a crer para os autores que a acção primária pode ser do tipo neurotóxica. Foi proposta uma forma alternativa para a acção metabólica do closantel, nomeadamente na glicólise com a acumulação de glucose 6-fosfato previa à redução do ATP. Também é observada uma diminuição do pH e diminuição do potencial de membrana levando à redução da motilidade do parasita. A acção do closantel pode servir para tornar disfuncionais os mecanismos responsáveis pela remoção do excesso de protões e manutenção da homeostasia no parasita. Estas substâncias provocam lesões no tegumento e causam paralisia espástica no parasita, resultante da penetração dos iões de cálcio nas células musculares. A paralisia provoca interrupção na alimentação e consequentemente fome, de forma que os parasitas têm de recorrer às suas reservas energéticas para sobreviver (Fairweather & Boray, 1999).

Closantel – Flukiver 5%® é administrado via subcutânea na dose de 5mg/kg (Apifarma, 2007) e é muito activo contra os parasitas adultos e revela boa actividade contra formas imaturas com 6-8 semanas de idade ou mais velhas, mas não é efectivo contra fases mais precoces (Fairweather & Boray, 1999). A sua actividade contra os parasitas hematofágicos está relacionada com a forte ligação à albumina plasmática (> 99%) (Mohammed-Ali & Bogan, 1987). O amolecimento das fezes e ligeira perda de apetite pode ser visto em alguns animais após o tratamento nas doses recomendadas. Doses elevadas podem provocar cegueira e sintomas de inactivação da fosforilação oxidativa, ou seja, hiperventilação, hipertermia, convulsões, taquicardia e morte (Taylor & Andrews, 1992).

Oxiclozanida – Não é comercializado em Portugal. Administrado via oral na dose 13-16 mg/kg tem um efeito significativo contra os adultos mas é ineficaz contra a maioria das formas imaturas. Também tem uma forte afinidade para a albumina plasmática, mas é metabolizado como um metabolito de glucuronida inactivo e eliminado na bÍlis mais rapidamente. A oxiclozanida é o único fasciolicida que se pode utilizar durante a lactação, uma vez que não tem intervalo de segurança (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). Pode provocar amolecimento transitório das fezes. (Radostitis *et al*, 2007)

2.10.11.3 Sulfonamidas

São o grupo do clorsulon, que tem um mecanismo de acção único. Através da inibição das enzimas glicolíticas 3-fosfoglicerato cinase e fosfogliceromutase, interrompe a glicólise que é a principal via metabólica utilizada pelo parasita para a produção de energia. A redução da disponibilidade de energia é acompanhada por uma paralisia flácida progressiva. O clorsulon liga-se à anidrase carbónica dos eritrócitos dos animais em tratamento, deste modo quando tem acesso ao parasita, por via oral durante a ingestão de sangue, provoca necrose das células digestivas do parasita (Fairweather & Boray, 1999). Ivomec F®, Virbamec F® são os produtos disponíveis que contêm clorsulon, sendo portanto fornecido em combinação com ivermectina (Apifarma, 2007). Uma dose de 2 mg/Kg via subcutânea mostrou ser bastante efectiva contra adultos de 14 semanas (Elitok, Elitok & Kabu, 2006).

2.10.11.4 Benzimidazóis

Actuam especificamente por fixação às tubulinas citoplasmáticas com consequente inibição da polimerização de microtúbulos interferindo com o metabolismo mitocondrial e ainda afectam a síntese de proteínas. Estes mecanismos parecem estar interrelacionados uma vez que qualquer alteração nos microtubulos é acompanhada por desorganização de organelas, em particular do aparelho de Golgi que está activamente envolvido na síntese de proteínas. Estes compostos induzem lesões nas células intestinais e no sistema reprodutor do parasita, interrupção da alimentação e da postura de ovos pelo parasita (Fairweather & Boray, 1999). Têm efeito ovicida cerca de 8 horas pós tratamento (Kassai, 1999). Tanto o triclabendazol como o albendazol são metabolizados pelo hospedeiro em compostos sulfóxidos que são mais solúveis e parecem ser os principais responsáveis pela acção fasciolicida. A interacção entre estes metabolitos e a albumina plasmática, para a qual têm uma certa afinidade, pode aumentar a disponibilidade dos princípios activos para os parasitas hematófagos (Chambers, Hoey, Trudgett, Fairweather & Timson, 2010).

Os pró-benzimidazóis são compostos precursores, cujos produtos farmacologicamente activos são metabolizados dentro do organismo via ruminal ou hepática. Netobimina → albendazol → ricobendazol, sendo a eficácia da conversão marcadamente mais baixa após administração parenteral relativamente à oral (Kassai, 1999). A netobimina é particularmente interessante porque, como é um sal iónico tem boa solubilidade em água o que promove flexibilidade nas suas administrações.

Este grupo de químicos é entre todos os antihelmínticos disponíveis o menos tóxico. No entanto alguns membros deste grupo têm demonstrado ser teratogénicos nos

bovinos. A netobimina e o albendazol são exemplos e têm portanto limitações de utilização em animais gestantes (Taylor & Andrews, 1992).

Triclabendazol – Fasinex® administrado por via oral numa dose de 12,5 mg/Kg e é o único antihelmintico especificamente activo contra *Fasciola hepatica* com 2 semanas de idade, ou seja, contra todas as fases larvares migratórias intra parenquimatosas, bem como contra os adultos dentro dos ductos biliares (Fairweather & Boray, 1999, Stevenson, Mahoney, Fisara, Strehlau & Reichel, 2002). Foi introduzido em 1981 (Taylor & Andrews, 1992) e difere na sua forma química dos outros benzimidazóis pela falta de um núcleo de carbamato, pela presença de iões cloreto e grupos tiometil adicionais (Fairweather & Boray, 1999). Alguns autores referem que o mecanismo de acção do triclabendazol sobre a *F. hepatica* não é conhecido e que não tem propriedades de ligação à tubulina, ao contrário dos outros membros deste grupo, devendo assim actuar por vias alternativas (Taylor & Andrews, 1992). Outros autores referem o contrário e sugerem uma acção semelhante aos restantes compostos do grupo (Stitt, Fairweather & Mackender, 1994, Brennan *et al*, 2007). Tem surgido resistência em populações de parasitas sujeitas a regimes intensivos de controlo com triclabendazol.

Albendazol – Valben 2.5%® é administrado via oral numa dose de 10mg/kg é um antihelmintico efectivo contra os parasitas adultos com mais de 12 semanas de idade. (Fairweather & Boray, 1999) e é ovicida, ao contrário do triclabendazol que não afecta a eclosão dos ovos de *F. hepatica* (Alvarez *et al*, 2009).

Netobimina – Este produto deixou de ser comercializado em Portugal para bovinos, mas existe no mercado a forma comercial para ovinos. A administração é feita via oral, dose de 20 mg/Kg e é eficaz contra os parasitas adultos (Radostitis *et al* 2007).

Para o tratamento de fasciolose aguda é essencial escolher um produto altamente efectivo contra os juvenis que lesionam o parênquima hepático. Para a forma crónica, é necessário um composto activo contra os parasitas adultos. A segurança dos produtos é uma consideração importante já que os mecanismos de destoxificação estão comprometidos. Todos os fasciolicidas ou têm períodos de retenção de leite ou é proibida a sua utilização em animais produtores de leite para consumo humano e assim a melhor altura para tratar vacas leiteiras é na fase de secagem. Muitos produtos combinam um fasciolicida com um nematocida, mas estes só devem ser utilizados quando há risco simultâneo dos dois tipos de parasita (Radostitis *et al* 2007).

Exemplo de aplicação:

Quando os animais são estabulados no inverno, uma dose de triclabendazol durante a estabulação deve remover as cargas de parasitas adultos e imaturos. Quando é administrado outro composto, deve-se realizar uma segunda dose quando voltam à pastagem para remover qualquer parasita que tenha falhado no 1º tratamento. Quando os animais estão estabulados pelo menos 8 semanas antes do 1º tratamento, a 2ª dose não deve ser necessária. Nos efectivos que estão sempre na pastagem, podem ser necessárias duas doses de antihelmintico, a 1ª no princípio do inverno para remover as cargas de parasitas adultos e imaturos adquiridas na abundante pastagem de Outono e a segunda no princípio da primavera para evitar uma elevada contaminação da pastagem e infecção do caracol hospedeiro intermediário (Taylor & Andrews, 1992).

Um trabalho realizado em França por Mage *et al* (2002) concluiu que o tratamento de fasciolose durante 10 anos não diminuiu efectivamente a prevalência da infecção por *F. hepatica* em bovinos e consequentemente nos caracóis, o que pode ser devido ao facto de que muitos criadores realizarem um único tratamento por ano.

Foi relatado que a supressão terapêutica de infecções por este parasita resultam num aumento significativo do peso vivo e ganho médio diário em animais de substituição. E ainda que o tratamento promova apenas uma excreção mínima de ovos nas fezes, o tratamento pode auxiliar a prevenção da infecção tratando os animais afectados e prevenindo as contaminações ambientais com a eliminação de ovos nas fezes (Elitok *et al*, 2006).

Alguns autores afirmam que o tratamento eficaz com eliminação das formas adultas e imaturas e prevenção da re-infecção permite a regeneração do tecido hepático com aparência normal em 2 anos (Owen, 1987). Outros afirmam que mesmo após o tratamento com um fasciolicida, as lesões devidas à colangite persistem, o que mostra a vantagem de administrar tratamento o mais cedo possível (Rondelaud, Dreyfuss & Vignoles, 2006)

2.10.12 Resistência aos anti-helmínticos

Devido ao ciclo de vida indirecto que alterna entre o caracol e o hospedeiro mamífero, a resistência nos parasitas é difícil de entender e quantificar. Supostamente a resistência ocorre nos parasitas em ovinos e bovinos após tratamentos com fasciolicidas. Para o triclabendazol que é activo contra formas adultas e juvenis, a selecção da resistência pode ocorrer em qualquer fase, enquanto que os outros compostos seleccionariam resistência nas formas adultas (Sangster, 2001). Durante a

reprodução assexuada no hospedeiro intermediário a selecção para a resistência e a eliminação de genes para a susceptibilidade pode desenvolver-se mais rapidamente. Assim, torna-se necessário a interrupção da utilização do fármaco antes que surja a ineficácia total ou a impossibilidade de haver susceptibilidade novamente (Borgsteede, Moll, Vellema & Gaasenbeek, 2005).

Assinalaram-se casos de resistência no mundo, especialmente ao triclabendazol. Na Austrália em 1995, Irlanda e Escócia em 1998, Escócia, País de Gales (Thomas, Coles & Duffus, 2000) Holanda (Moll *et al*, 2000), Espanha (Álvarez-Sánchez, Mainar-Jaime, Pérez-Garcia & Rojo-Vásquez, 2006). Foram ainda descritos casos de resistência a salicilanilidas e ao nitroxinil (Fairweather & Boray, 1999). Apesar da resistência ao triclabendazol nunca ter sido registada em bovinos, na Holanda também foi descrita nesta espécie, possivelmente porque neste caso bovinos e ovinos co-habitavam a mesma pastagem e é possível que parasitas resistentes tenham infectado os bovinos (Moll, Gaasenbeek, Vellema & Borgsteede, 2000).

Algumas estratégias foram propostas para ajudar a evitar ou pelo menos reduzir o desenvolvimento e dispersão da resistência aos fasciolicidas. A elevada frequência de tratamentos aumenta a probabilidade de resistência, portanto deve-se limitar o número de tratamentos ao necessário. O “timing” dos tratamentos é importante, devem ser administrados em determinadas alturas do ano (Daniel & Mitchell, 2002) com base em dados epidemiológicos e numa dosagem adequada. Efectuar uma rotação anual dos antihelmínticos utilizando drogas de diferentes grupos químicos ou então utilizar combinações de princípios activos (Fairweather & Boray, 1999; Sangster, 2001). A aplicação destas combinações pode ter particular interesse nas estirpes resistentes de *F. hepatica*. A combinação de drogas sinérgicas tem a vantagem de actuar contra parasitas adultos e imaturos em doses reduzidas e com baixos níveis residuais nos tecidos, bem como o potencial aumento do espectro de acção contra outras infecções parasitárias (Coles, Rhodes & Stafford, 2000, Hutchinson, Dawson, Fitzgibbon & Martin, 2009). Um exemplo do sucesso destas combinações é a associação de nitroxinil com clorsulon e ivermectina que revelou ser altamente eficaz contra parasitas com 2-4 semanas de idade (Hutchinson *et al* , 2009).

Se há suspeita de resistência, pode ser sensato assegurar a eficácia dos antihelmínticos realizando exames fecais de rotina 2 a 3 semanas pós tratamento (Mitchell, 2002).

2.10.13 Prevenção/Controlo

F. hepatica requer um hospedeiro intermediário, portanto o seu controlo deve basear-se na destruição dos parasitas dentro do organismo animal, para evitar que se

comportem como difusores de ovos com as fezes e na destruição dos hospedeiros intermediários bem como noutras medidas complementares de forma a deixar os terrenos em condições desfavoráveis para a vida dos ovos e moluscos intermediários. A fasciolose, devido à sua ampla distribuição entre os ruminantes e muitas espécies silváticas que contribuem para a difusão da parasitose e a sua permanência nas zonas onde habitam (Eslami, Hosseini & Meshgi, 2009), é difícil de erradicar (Armour, 1975). Os cães e outros carnívoros também merecem especial atenção, uma vez que ao consumir nos matadouros os fígados rejeitados pela fasciolose, transformam-se em portadores quando os ovos atravessam o aparelho digestivo e são eliminados normalmente para prosseguir a sua evolução normal. Como o cão pode ser um portador assintomático, torna-se ainda mais difícil um bom controlo. Uma das medidas a tomar é conhecer quais as zonas invadidas pelo molusco dentro de uma zona a tratar, uma vez que não estão uniformemente distribuídos, mas sim em habitats restritos que oferecem as condições mais adequadas ao longo do ano. Depois devem analisar-se os vários métodos de luta contra eles, segundo as condições ecológicas, hidrológicas e económicas. O mais provável é que se recorra a mais do que um método de controlo (Heras, 1974).

2.10.13.1 Controlo através do hospedeiro definitivo

A forma mais importante e generalizada de profilaxia em todo o mundo é a aplicação estratégica de fasciolicidas que eliminam os parasitas dos animais infectados e que também contribui para a redução da contaminação das pastagens.

Não há desenvolvimento de protecção imunitária após a eliminação do parasita, a recontaminação ocorre rapidamente e portanto são necessários tratamentos repetidos. O programa de tratamentos deve ser estabelecido dependendo do risco a que os animais estão sujeitos. Nas áreas de baixo risco, o conhecimento do sistema de produção e visita aos possíveis habitats dos caracóis permite a discriminação de animais em risco que são susceptíveis de ser infectados. Se houver confirmação por exemplo, via diagnóstico serológico estes animais devem ser tratados. Outros grupos em zonas seguras não serão tratados e uma avaliação serológica anual no início do inverno pode confirmar a ausência de fasciolose.

O tratamento precoce dos efectivos com fasciolose é obrigatório, de forma a pelo menos diminuir a pressão e prevalência do parasita (Eslami, *et al*, 2009).

O Outono é considerado como o período durante o qual as metacercárias são mais abundantes nas zonas de elevado risco no entanto o início da Primavera não deve ser considerado como livre de perigo devido às larvas que sobrevivem no Inverno nos caracóis que se infectaram no Outono anterior (Jaquiet, 2008). Em áreas endémicas

deveriam ser aplicados pelo menos dois tratamentos anuais, um no início da Primavera que evita a contaminação das pastagens e outro no fim do Outono, se não se verificarem casos agudos antes (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

A escolha do fármaco, não considerando o preço, deve basear-se no conhecimento da sua eficácia contra as diferentes fases do desenvolvimento de *F. hepatica*, e a epidemiologia local que nos permite conhecer a altura em que o risco de infecção é maior (Cunha, Marques & Mattos, 2007) (fundamentalmente no Outono).

Para otimizar a eficácia de aduicidas estritos como a oxiclozanida, albendazol e clorsulon, são recomendados dois tratamentos com um intervalo de 8 a 10 semanas. Os adultos presentes na altura do primeiro tratamento são eliminados e a inibição que estavam a exercer no desenvolvimento de formas imaturas desaparece. Assim, os parasitas imaturos que se desenvolvem em adultos na altura do segundo tratamento também são eliminados (Armour, 1975).

Em animais que são estabulados durante o Inverno para evitar que eliminem ovos de *F. hepatica* e que contaminem os caracóis na Primavera/Verão, é indispensável destruir a totalidade dos parasitas durante o Inverno. Assim, pode-se administrar o triclabendazol 2 semanas após a entrada para o estábulo ou o nitroxinil e o closantel administrados 6 semanas após o mesmo.

No que diz respeito aos aduicidas estritos recomenda-se utilizá-los duas vezes, a primeira após a estabulação e a segunda 2 meses e meio depois.

O autor refere ainda que nas regiões muito contaminadas, não basta apenas o tratamento de Inverno e as contaminações da Primavera e Verão têm de se ter em consideração. Desta forma recomenda o tratamento 3 vezes por ano: em Junho/Julho, em Setembro e no início da estabulação (Jacquiet, 2008).

O controlo de fasciolose em vacas leiteiras torna-se um grande desafio devido à falta de um antihelmintico adequado que possa ser utilizado em animais em lactação. A escolha limita-se à oxiclozanida, enquanto que os restantes tratamentos disponíveis têm um intervalo de segurança significativo e são ineficazes contra os parasitas imaturos. Como resultado, os animais têm de ser tratados no período seco, o que torna os tratamentos inadequados no que diz respeito à frequência ou à altura do ano, para obter um óptimo controlo (Schweizer, Braun, Deplazes & Torgerson, 2005).

Muitas vezes as explorações sofrem de poliparasitismo onde estrongilídeos gastrointestinais e trematodes são identificados e afectam animais de todas as idades. De acordo com a sua patogenicidade estas parasitoses são controladas com base num protocolo de desparasitação, respeitante quer a um único parasita quer a grupos de parasitas. Para o sucesso da desparasitação o veterinário deve assim desenvolver

estratégias de tratamento com objectivo e realistas, tendo em conta os dados epidemiológicos locais.

2.10.13.2 Controlo através do hospedeiro intermediário

O tratamento de grupos infectados deve ser acompanhado de medidas agronómicas numa tentativa de prevenir o acesso a zonas contaminadas de forma a limitar a reinfecção.

2.10.13.2.1 Reconhecimento e controlo dos habitats de caracóis

A cartografia das explorações tem de ser realizada para identificar os habitats temporários ou permanentes. A avaliação durante várias épocas diferentes é desejável e deve ser revista nos anos em que os verões são particularmente húmidos. A investigação deve incluir micro regiões geográficas de forma a apreciar os riscos presentes por metacercárias flutuantes, que podem ser transportadas para longe dos seus locais de oclusão.

A procura dos potenciais habitats nas pastagens deve fazer-se durante a Primavera ou Outono, períodos em que as populações de caracóis são mais abundantes e mais acessíveis para observar. A evidência dos caracóis permite convencer o criador da necessidade de um plano de luta integrada, e estimar a área de risco comparada com a área total da pastagem. Nalguns casos esta é muito limitada, no entanto apenas algumas dezenas de m² de superfície bastam para assegurar a presença da fasciolose numa exploração. Por vezes é difícil isolar parcelas desprovidas de habitat de caracóis (Jacquiet, 2008).

2.10.13.2.2 Drenagem e vedação

Quando os locais das áreas dos caracóis são limitados, o contacto entre os bovinos e os caracóis pode ser restrito pela colocação de cercas ou por drenagem da zona, desde que porém seja controlado o fornecimento de água aos animais, principal factor limitante deste método. Estas medidas têm de ser avaliadas caso a caso e muitas vezes acabam por ser difícil de implementar por razões económicas ou práticas. Em áreas de risco elevado, a presença dos caracóis em múltiplas localizações dentro da pastagem, dificulta a erradicação.

A drenagem é para alguns autores a solução mais eficaz a longo prazo (Armour, 1975), mas nem sempre é possível efectuar nas configurações da pastagem. Nem sempre é uma solução rentável em áreas de pastagem. A utilização de vedações em torno de áreas com água e dos habitats dos caracóis é muitas vezes a solução mais

fácil (Roberts & Suhardono, 1996) e menos dispendiosa. A construção de bebedouros adequados afastaria os animais das zonas húmidas (Armour, 1975).

A rotação das pastagens ou de hospedeiros de forma a reduzir o risco de infecção, também pode ser eficaz (Knubben-Schweizer *et al*, 2009). O estrume é um meio de fertilização das terras e por isso deve também ser controlado para evitar contaminação do ambiente. Assim podem utilizar-se métodos como o armazenamento do estrume por 2 meses, digestão anaeróbica, digestão aeróbica, secagem a altas temperaturas, método electroquímico, ondas UV ou radioactivas, pasteurização (Eslami *et al*, 2009).

2.10.13.2.3 Métodos Biológicos

Consistem essencialmente em colocar nas pastagens muito afectadas por *Limneas* inimigos naturais como as aves. Algumas observações feitas em pequenas parcelas de experimentação, mostram que as aves alimentam-se dos caracóis e apesar de não os fazer desaparecer dos terrenos, diminuem a sua quantidade. Outros animais úteis na destruição dos caracóis são os ouriços, pirilampos, rãs, sapos e algumas larvas de dípteros alimentam-se exclusivamente dos corpos vivos dos caracóis (Heras, 1974). A luta biológica, possível outrora, está actualmente posta de parte, devido à dificuldade (demasiado complexa) de ser posta em prática (Rondelaud *et al*, 2006).

2.10.13.2.4 Uso de moluscidas

Estes químicos podem destruir selectivamente os caracóis hospedeiros intermediários, mas devido a riscos ambientais, custo dos produtos, sua eficácia limitada, assim como a sua dificuldade de aplicação, estas substâncias são actualmente pouco ou nada utilizados ou mesmo proibidos (Rondelaud, Vignoles, Dreyfuss & Mage, 2006). A sua eficácia é variável e depende das características dos solos e da época do ano (Crossland, 1976) e a sua utilidade na prática é discutível devido ao elevado potencial biótico dos caracóis (Cunha *et al*, 2007). Os produtos que são exclusivamente moluscidas como o pentaclorofenato de sódio, niclosamida e N-trítol-morfolína foram retirados no mercado. A cianamida de cálcio, numa dose de 500 Kg por 7 hectares tem alguma actividade moluscida, assim como é tóxica para formas livres (miracídeo e cercária) que acrescenta ao solo propriedades benéficas. A sua utilização como tratamento do solo requer certas precauções (Jacquiet, 2008).

De acordo com Heras estes compostos devem ter as seguintes características: ser activos a altas diluições; tóxicos não só para os caracóis adultos mas também para os ovos; activos para grandes intervalos de pH (5-8.5) e de temperatura (15-38); fotoestáveis, ou seja, devem resistir à luz do sol pelo menos por 24 horas; estáveis em

todos os climas e de fácil conservação; inofensivos ou muito pouco tóxicos para o manipulador; não deixar resíduos; fácil aplicação; económico (Heras, 1974).

Na Europa, evidências experimentais mostram que as aplicações dos moluscicidas devem ser efectuadas ou na Primavera, para destruir populações de caracóis antes do início da época de reprodução, ou no Verão para destruir caracóis infectados. A aplicação do moluscicida deve ser combinada com o tratamento anti-helmíntico para remover populações existentes de tremátodes e consequentemente a contaminação de habitats com ovos (Ollerenshaw, 1971).

Os efeitos patogénicos de *Fasciola hepatica* são múltiplos e reais apesar de baixas intensidades de infecção. O conhecimento preciso da bioecologia do hospedeiro intermediário, das pastagens e do sistema de produção próprio de cada exploração, permite ao veterinário elaborar uma luta adaptada. Só através desta marcha a prevenção da fasciolose é eficaz e proveitosa para o rebanho, e para o produtor (Jacquiet, 2008)

2.10.14 Vacinação

Vários antígenos de *F. hepatica* têm sido investigados para determinar se conseguem estimular/desenvolver uma resposta imunitária protectora. Estes incluem proteínase catepsina L, proteínas ligantes aos ácidos gordos, transferase-S-glutationa (TSG) e hemoglobina (Fairweather & Boray, 1999).

Estudos experimentais demonstraram o atraso no crescimento dos parasitas e consequentemente da sua entrada nos ductos biliares, menor tamanho das fasciolas adultas, redução na produção de ovos e demora no aparecimento da anemia. A utilização de metacercárias irradiadas e fracções antigenicas parasitárias promovem um certo grau de resistência nos bovinos (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

Foi realizado um estudo em bovinos para avaliar o potencial imunoprolático de duas proteases catepsina L (L1 e L2) e de hemoglobina (Dalton, McGonigle, Rolph & Andrews, 1996). As catepsinas, como já foi descrito anteriormente são moléculas secretadas pelo parasita e estão envolvidas em funções importantes como a penetração nos tecidos, evasão imunitária e alimentação. A vacinação de bovinos com estas moléculas induz uma redução das cargas parasitárias de 42-69% e uma redução de aproximadamente 60% na viabilidade dos ovos eliminados pelos parasitas sobreviventes (Dalton & Mulcahy, 2001). A hemoglobina parasitária trata-se de uma molécula que contém um grupo heme e está envolvida na respiração aeróbia das formas imaturas e em funções oxigénio dependentes nos parasitas adultos como produção de ovos. Os ensaios revelaram que foi conseguida uma protecção de 72,4%

contra a infecção por vacinação com catepsina L2 e hemoglobina. Os parasitas que sobreviveram eram atrofiados e consequentemente os animais vacinados revelaram menor lesão hepática. Além do que, mais de 98% dos ovos produzidos pelos parasitas que se desenvolveram nestes animais vacinados não embrionaram, o que poderia ter um efeito significativo na extensão da contaminação da pastagem e consequentemente na transmissão da doença. Apesar dos preparados vacinais terem induzido altos títulos de anticorpos que aumentaram após o desafio da infecção, os autores afirmam que não houve correlação entre o título de anticorpos e protecção (Dalton *et al*, 1996; Mulcahy *et al*, 1997).

Outro estudo revela um nível de protecção elevada (83%) com aplicação de vacinas multivalentes utilizando proteases típicas de fases juvenis do parasita e proteases mais comuns em fases adultas de *F. hepatica* (catepsina B e catepsina L5, respectivamente). Os autores sugerem que o mecanismo de protecção induzido por estas vacinas está relacionado com a produção de anticorpos após vacinação que neutraliza a actividade das proteases, activação dos mecanismos celulares efectores ou afectando directamente o parasita (aquisição de nutrientes) ou a combinação destes (Jayaraj *et al*, 2009). O adjuvante que é utilizado para distribuir a vacina é crítico na determinação da qualidade da resposta imunitária e desta forma, no nível de protecção alcançado (Morrison *et al*, 1996; De Bont *et al*, 2003; Jayaraj *et al*, 2009).

Outras moléculas de *F. hepatica* incluindo GST e um membro da família das proteínas ligantes aos ácidos gordos (PLAG) são candidatas à síntese de vacinas para conferir protecção contra a infecção. As GST são importantes para a destoxificação de compostos tóxicos endógenos e exógenos (Mulcahy & Dalton, 2001) e em vários ensaios induziram níveis de protecção de 19-69%. As PLAG induziram protecção em 55% nos bovinos após infecção (Dalton & Mulcahy, 2001).

Na ausência de uma imunidade protectora natural, o desenvolvimento de vacinas é particularmente difícil. Todos os ensaios vacinais realizados até hoje mostram-se muito pouco conclusivos, principalmente em condições naturais. A vacina contra *F. hepatica* surge portanto numa perspectiva distante.

2.10.15 Importância

As perdas que a doença origina nos ruminantes são importantes, não só pela morte dos animais, mas também pela diminuição da produção de carne e de leite, nas explorações leiteiras os animais podem ter dificuldade em manter a gestação o que tem consequências na produção do leite e a sua depreciação para venda, as perdas provenientes das rejeições hepáticas, a fraqueza que torna os animais mais sensíveis a doenças infectocontagiosas e parasitárias, as despesas em alimentação,

tratamentos, etc. (Cunha *et al*, 2007). Deve-se ainda assinalar que nos animais com fasciolose, devido à debilidade orgânica, as vacinas que lhes são administradas não vão conferir o grau de imunidade desejado (Heras, 1974).

Esta parasitose pode fazer diminuir a gordura e a proteína do leite e esta depressão na qualidade do leite pode ser vista na ausência de outros sinais clínicos de fasciolose (Taylor & Andrews, 1992). Num estudo realizado para avaliar a associação entre a infecção por *F. hepatica* e os parâmetros de produção em vacarias leiteiras sugere que as infecções não afectam a fracção proteica do leite, enquanto se verifica um efeito negativo na gordura (Charlier, Duchateau, Claerebout, Williams & Vercruysse, 2007).

As alterações estruturais e metabólicas que a *F. hepatica* produz são um factor limitante da produção pecuária. As perdas directas por mortes ou rejeições são numerosas para a indústria da carne, no entanto a maior frequência da forma subclínica faz com que as perdas indirectas sejam superiores. Contudo são mais difíceis de quantificar e referem-se à redução dos índices de crescimento e conversão, à diminuição das produções láctea e cárnea, à interferência na fertilidade e fecundação, à maior susceptibilidade a outras infecções, assim como despesas de tratamentos (Schweizer *et al*, 2005; Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999)

Num estudo realizado em novilhos para determinar o efeito de diferentes níveis de infecção sobre o crescimento dos animais, revelou que as infecções experimentais reduzem a taxa de crescimento. Os autores afirmam que o momento (mais significativo nas primeiras 12 semanas de infecção) e a severidade das alterações no peso vivo estão dependentes da carga parasitária e da qualidade da dieta disponibilizada aos bovinos (Chick, Coverdale & Jackson, 1980).

Os parâmetros observáveis na doença crónica incluem diminuição da taxa de concepção/gestação, atraso na puberdade, diminuição da taxa de partos, baixo peso à nascença, que são consequências de um fraco fornecimento de minerais e proteínas à medula óssea como resultado de uma lesão hepática extensiva característica de fasciolose crónica. Apesar de alguns estudos demonstrarem a relação entre a seroprevalência de *F. hepatica* e o surgimento de vacas “repeat breeder”, estes autores não conseguiram detectar tal relação (Simsek *et al*, 2006). Charlier *et al* (2007) também confirmam uma diminuição das taxas de concepção e de parto por aumento do intervalo entre partos nos animais com altos níveis de anticorpos. Num ensaio realizado em bezerros ao desmame com infecções subclínicas, o tratamento não obteve efeito significativo no ganho de peso. Também foi sugerido que o tratamento desta parasitose melhora a reprodução nos bovinos através do aumento no crescimento e condição corporal. Outros estudos sugerem que a fertilidade em

novilhas pode ser afectada por fasciolose através da interrupção do normal metabolismo das hormonas sexuais no fígado, resultando num atraso da maturidade sexual (Loyacano, Williams, Gurie & DeRosa, 2002).

Os bovinos parasitados são mais susceptíveis à infecção por *Salmonella dublin*, provavelmente devido à supressão da hipersensibilidade contra as bactérias, sendo que os animais afectados são incapazes de as eliminar dos seus tecidos e actuam como portadores activos (Aitken, Jones, Hall, Hughes & Brown, 1981).

Está também reportada a associação entre infecção por *F. hepatica* e o estabelecimento de doenças metabólicas em vacas de alta produção leiteira com graves consequências económicas (Mason, 2002)

A fasciolose é actualmente reconhecida como uma importante doença humana re-emergente em que 17 milhões de humanos são considerados infectados e 180 milhões estão em risco de infecção (Hurtrez-Boussès *et al*, 2001). A doença ocorre em humanos frequentemente associada à ingestão de agriões e outras plantas aquáticas de áreas endémicas. Um estudo realizado para avaliar o potencial zoonótico de *F. hepatica*, sugere que pessoas que consumam pratos preparados com fígados crus de bovinos infectados com formas imaturas, podem tornar-se infectados e desenvolver a doença (Taira, Yoshifuji & Boray, 1997).

2.10.16 Situação em Portugal

Relativamente à situação em Portugal são poucos os estudos efectuados e a maior parte dizem respeito à prevalência da doença baseada em dados de matadouro. Os primeiros estudos foram realizados por Silva Leitão na década de 1950 que mostrou elevadas incidências de fasciolose bovina no norte do país. Mais tarde, em 2000, estudos realizados na reserva da Tapada de Mafra revelaram a presença de *F. hepatica* em animais silváticos como o javali e o gamo através da pesquisa de formas adultas e das lesões observadas nos fígados dos animais, verificando um aumento da prevalência nas duas populações relativamente ao ano de 1992 (Sousa, 2001). Em 1996 foi realizado um estudo de prevalência de fasciolose nos matadouros de Aveiro e Vale de Cambra no qual foram quantificados os animais infectados provenientes dos concelhos de Vagos, Ílhavo e Estarreja, levando a concluir que existem animais infectados nestas zonas do país (Conceição, 2001). Estão também descritas incidências em bovinos abatidos nos Açores e Coimbra e numa análise comparativa realizada com dados fornecidos pelas DIVs de Viseu, Coimbra, Aveiro e Leiria constatarem que os bovinos com fígados rejeitados por fasciolose provinham sobretudo das DIVs de Aveiro e Coimbra e ainda que a proporção de fígados

rejeitados por fasciolose em bovinos provenientes da DIV de Aveiro é muito superior à verificada na DIV de Coimbra (Fidalgo, 2007).

CAPÍTULO III - Parte prática

3.1 Estudo A:

O objectivo inicial do trabalho era tentar estabelecer uma relação entre a infecção por *F. hepatica* e o diagnóstico da tuberculose em bovinos. Para tal idealizou-se um modelo experimental com duas intervenções num efectivo que estava sob sequestro, no distrito de Évora, devido à detecção de lesões de tuberculose num vitelo em matadouro. A primeira consistia na recolha de fezes para realizar os exames coprológicos como meio de diagnóstico de fasciolose numa amostra (n); a realização da desparasitação dos animais com um fasciolicida adequado e a realização da prova intradérmica da tuberculina e da pesquisa do IFN γ no soro como diagnóstico de tuberculose. A segunda intervenção seria realizada 42 dias depois com nova recolha de fezes dos mesmos animais e realização dos testes de diagnóstico de tuberculose e posterior análise dos resultados.

3.2 Estudo B:

Foi efectuado um estudo de prevalência de fasciolose bovina baseado no diagnóstico coprológico na região de Odemira. Este estudo foi efectuado entre os meses de Janeiro e Maio de 2010 e englobou 7 explorações.

3.3 Materiais e Métodos

Estudo A

Animais e colheita de amostras

As amostras foram colhidas aleatoriamente num efectivo constituído por 190 animais, cuja desparasitação com um fasciolicida não era realizada há cerca de 2 anos. Alguns animais deste efectivo apresentavam sinais clínicos que levavam à suspeita da presença de *F. hepatica*, além disso, algumas zonas da pastagem onde os animais permaneciam podiam corresponder a habitats do hospedeiro intermediário.

Foram colhidas aproximadamente 100 g de fezes numa amostra de 30 vacas/novilhas em Março de 2010. As amostras foram colhidas individualmente com uma luva obstétrica via rectal e acondicionadas na mesma, sendo esta devidamente fechada e identificada. Foram posteriormente transportadas através de uma arca térmica devidamente refrigerada até ao local do processamento das coprologias (Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV, UTL – Lisboa), onde permaneceram em refrigeração até ao dia seguinte.

Exame coprológico

A presença de ovos de *F. hepatica* nas amostras fecais foi avaliada por uma técnica qualitativa, de sedimentação natural que consiste em homogeneizar com uma vareta de vidro uma certa quantidade de fezes com uma quantidade de água, aproximadamente 3 ou 4 gramas de fezes para 15 ou 20 mL de água num copo. Depois de homogeneizada a mistura é filtrada com um passador e um funil para um tubo de ensaio e é centrifugada durante 3 minutos a 1500 rpm. Após centrifugação elimina-se o sobrenadante, coloca-se 1 ou 2 gotas de Azul de Metileno no sedimento e homogeneiza-se com uma pipeta de Pasteur. Coloca-se uma amostra entre lâmina e lamela e observa-se ao microscópio nas objectivas de 4x, 10x e 40x.

Estudo B

Foram recolhidas fezes de 10 animais por exploração, com sinais clínicos característicos da patologia. As amostras fecais foram colhidas individualmente, utilizando o mesmo método descrito no estudo A, armazenadas em refrigeração e enviadas para o laboratório de parasitologia da FMV, UTL – Lisboa. A técnica coprológica para detecção de ovos de *F. hepatica* também foi a mesma realizada no estudo A.

Nos dois últimos efectivos do estudo, aos mesmos animais que se recolheram fezes, foi recolhido sangue para realização de um teste serológico para pesquisa de anticorpos e enviado para o Laboratório de Sanidade Animal e Segurança Alimentar.

3.4 Resultados

Estudo A

Não foram observados ovos de *F. hepatica* em 100% da amostra.

Presença de ovos nas fezes	Nº animais
Positivo	0
Negativo	30

Quadro 2 - Resultados do exame coprológico

Estudo B

Coprologia: Não foram observados ovos de *F. hepatica* em 100% da amostra.

Serologia: Foram detectados anticorpos contra *F. hepatica* em 100% da amostra, ou seja em 20 animais (anexo 3).

3.5 Discussão e Conclusão

Ao contrário do que alguns autores referem, os resultados obtidos neste trabalho (estudo A) revelam uma sensibilidade muito baixa uma vez que 100% dos animais aos quais foram colhidas fezes para pesquisa de ovos de *F. hepatica* obtiveram resultados negativos. Resultados iguais foram observados no estudo de prevalência de fasciolose (estudo B) que sugere a falta de sensibilidade deste método diagnóstico, comparando com o método serológico que revela 100% de animais positivos, o que está em concordância com o referido na bibliografia.

Alguns factores podem contribuir para a baixa sensibilidade do método coprológico, entre os quais o reduzido número de ovos eliminados nas fezes pelos bovinos (Happish & Boray, 1969), a variação da eliminação dos ovos pelas fezes ao longo do dia e entre dias, o que pode revelar a necessidade da realização de várias colheitas, embora não seja prático (Kassai, 1999). O ciclo de vida é também importante, uma vez que os ovos só são produzidos quando os parasitas atingem a maturidade nos ductos biliares, o que ocorre por volta da 10ª semana após a infecção (Simsek *et al*, 2006), apesar de que nos dois estudos aqui apresentados o intervalo de tempo em que as colheitas de fezes foram efectuadas seria suficientemente extenso (de Janeiro a Maio) para ultrapassar esta limitação.

Apesar de ser um método simples e rápido de efectuar, a coprologia pode não ser o melhor método para o diagnóstico de fasciolose bovina, os métodos coprológicos podem ser modificados de forma a melhorar a sensibilidade dos mesmos, o que deveria ser objecto de estudo. No entanto, mesmo que tivessem uma elevada sensibilidade, estes testes não têm utilidade para o diagnóstico de infecções recentes, o que pode ser importante e decisivo para o sucesso do tratamento e recuperação das lesões de animais doentes. Muitas vezes os animais afectados não apresentam sinais clínicos evidentes. No entanto têm quebras de produção o que pode resultar em perdas económicas significativas e desta forma pode ser importante a monitorização da presença de *F. hepatica* nos efectivos de modo a que o médico veterinário assistente possa tomar as medidas profilácticas adequadas.

3.6 Casos Clínicos

Neste capítulo são descritos alguns casos clínicos provenientes de solicitações de assistência veterinária por parte de produtores, que estiveram relacionados com fasciolose bovina.

- a) História Pregressa: Vaca de raça Limousine, cerca de 8 anos e parida há 2 dias. O produtor revelou que a vaca tinha retenção placentária, diminuição do apetite, apatia e escassa produção de leite.

Exame Clínico: Ao exame clínico além da depressão evidente, apresentava também emaciação, pêlo baço e seco, as mucosas (principalmente a mucosa oral) ictéricas e fezes mucoides.

Diagnóstico: Além do problema da retenção placentária, suspeitou-se de fasciolose.

Tratamento: Foi realizado o tratamento com closantel (Flukiver®) via subcutânea e Ornipur® utilizado como protector hepático. Neste caso a vaca recebeu também tratamento para a retenção placentária que consistiu na dequitação manual e na administração de coprostenol (Estrumate®) e oxitetraciclina como antibioterapia.

- b) História Pregressa: Vaca de raça cruzada com 6 anos com anorexia.

Exame Clínico: Apresentava condição corporal muito baixa (1,5-2), estava bastante apática, tinha o pelo seco, baço e quebradiço. Ao exame físico revelou uma coloração pálida amarelada das mucosas (especialmente a mucosa oral), atonia ruminal e fezes escassas, esteatorreicas, mucoide e com pedaços de alimento mal digeridos.

Diagnóstico: Pensou tratar-se de um caso de fasciolose.

Tratamento: Foi efectuado o tratamento com closantel (Flukiver®) e ainda uma ivermectina para o tratamento de outros parasitas gastrointestinais. Foi também administrado Ornipur® como auxiliar do restabelecimento da função hepática e antibioterapia para prevenção de infecções secundárias.

- c) História pregressa: Vaca com 7 anos de raça cruzada foi motivo de consulta porque o produtor referiu que se apresentava intoxicada e com diminuição da produção de leite.

Exame Clínico: Ao exame físico apresentava falta de coordenação dos movimentos, grande prostração, sinais de cólica, edema submandibular e orbital com congestão dos vasos da esclera, as mucosas estavam pálido-ictéricas e apresentava hipotermia. À auscultação revelou atonia ruminal, bradiarritmias e diminuição da intensidade dos batimentos cardíacos. As fezes eram escassas e secas. Segundo a história pregressa, o único factor que poderia estar na origem desta intoxicação seria a ingestão de erva-azeda

(*Oxalis pes caprae*) que está muitas vezes associada a problemas de intoxicação quando existem outros factores que dificultem a função hepática.

Diagnóstico: Neste caso a suspeita recaiu na infecção por *F. hepática*.

Tratamento: Foi iniciado o tratamento com fluidoterapia, closantel, Ornipur®[®], membutona (Indigest®) para auxiliar a função gastrointestinal. Foi também administrado via oral carvão activado de forma a impedir a absorção de toxinas que pudessem agravar o estado de toxémia. Como suporte foi realizada uma corticoterapia para estimulação da neoglucogénese, metamazol sódico (Vetalgin®) para alívio das cólicas e antibioterapia para evitar infecções secundárias.

Evolução: Esta vaca foi acompanhada durante cerca de uma semana, após a qual recuperou do estado de toxémia, a função digestiva foi restabelecida e também gradualmente a produção de leite.

- d) História Pregressa: Um caso semelhante ao anterior foi o de uma vaca de raça Limousine com cerca de 10 anos e com uma gestação avançada, cujo proprietário referiu que apresentava diminuição do apetite, perda de condição corporal e ingestão de erva-azeda.

Exame Clínico: Ao exame físico revelou-se bastante apática, com fraqueza, emaciação e tremores musculares. O úbere não apresentava desenvolvimento para uma gestação tão avançada. As mucosas estavam ligeiramente ictéricas e a auscultação apresentava a motilidade ruminal comprometida e arritmias. As fezes eram moles, mucoides e com aspecto gorduroso (esteatorreicas).

Diagnóstico: Infecção por *F. hepatica* com intoxicação por erva-azeda secundária.

Tratamento: Foi efectuado o tratamento de suporte com fluidoterapia, cálcio, fósforo e magnésio endovenosos devido à sua condição reprodutiva e uma vez que apresentava tremores musculares. Foi administrado closantel, Ornipur®[®] e feita antibioterapia.

Evolução: No dia seguinte a vaca teve um parto distócico, o qual foi assistido e foi novamente fornecida terapia de suporte com fluidoterapia e suporte nutricional, no entanto o animal acabou por morrer no dia seguinte e nunca chegou a produzir leite.

Bibliografia

Aitken, M.M.; Jones, P.W.; Hall, G.A.; Hughes, D.L. & Brown, G.T. (1981). Responses of fluke-infected and fluke-free cattle to experimental reinfection with *Salmonella dublin*. *Research in Veterinary Science*, 31: 120-126.

Aitken, M.M.; Jones, P.W.; Hall, G.A.; Hughes, D.L. & Collis, K.A. (1978). Effects of experimental *Salmonella dublin* infection in cattle given *Fasciola hepatica* thirteen weeks previously. *Journal of Comparative Pathology*, 88: 75-84.

Alvarez, L.; Moreno, G.; Moreno, L.; Ceballos, L.; Shaw, L.; Fairweather, I. & Lanusse, C. (2009). Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs. *Veterinary Parasitology*, 164: 211-216.

Álvarez-Sánchez, M.A.; Mainar-Jaime, R.C.; Pérez-García, J. & Rojo-Vásquez, F.A. (2006). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *The Veterinary Record*, 159: 424-425.

Anderson, P.H.; Berrett, S.; Brush, P.J.; Hebert, C.N.; Parfitt, J.W. & Patterson, D.S.P. (1977). Biochemical indicators of liver injury in calves with experimental fascioliasis. *The Veterinary Record*, 100:43-45.

Andrews, S.J. (1999). The life cycle of *Fasciola hepatica*. In J.P. Dalton (Ed.), *Fasciolosis*. (pp. 1-20). Cambridge: CAB INTERNATIONAL.

Apifarma (2007). Endoparasiticidas. In *Simposium Veterinário. Medicamentos e Produtos de Saúde Animal*. (pp. 417-428). Madeira & Madeira S.A.

Arias, M.; Hillyer, G.V.; Sánchez-Andrade, R.; Suárez, J.L.; Pedreira, J.; Lomba, C.; Díaz, P.; Morondo, P.; Díez-Baños, P. & Paz-Silva, A. (2006). A 2.9 kDa *Fasciola hepatica*-recombinant protein based ELISA test for the detection of current-ovine fasciolosis trickle infected. *Veterinary Parasitology*, 137: 67-73.

Armour, J. (1975). The epidemiology and control of bovine fasciolosis. *The Veterinary Record*, 96: 198-201.

Beckham, S.A.; Piedrafita, D.; Phillips, C.I.; Samarawickrema, N.; Law, R.H.P.; Smooker, P.M.; Quinsey, N.S.; Irving, J A.; Greenwood, D.; Verhelst, S.H.L.; Bogyo,

M.; Turk, B.; Coetzer, T.H.; Wijeyewickrema, L.C.; Spithill, T.W. & Pike, R.N. (2009). A major cathepsin B protease from liver fluke *Fasciola hepatica* has atypical active site features and a potential role in the digestive tract of newly excysted juvenile parasites. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41: 1601-1612.

Borgsteede, F.H.M.; Moll, L.; Vellema, P. & Gaasenbeek, C.P.H. (2005). Lack of reversion in triclabendazole-resistant *Fasciola hepática*. *The Veterinary Record*, 156: 350-351.

Bossaert, K.; Jacquinet, E.; Saunders, J.; Farnir, F. & Losson, B. (2000). Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle, and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 88: 17-34.

Bowman, D.D. (2003). *Georgie's Parasitology for Veterinarians*. (8th edition). USA: Elsevier.

Brennan, G.P.; Fairweather, I.; Trudgett, A.; Hoey, E.; McCoy, McConville, M.; Meaney, M.; Robinson, M.; McFerran, N.; Ryan, L.; Lanusse, C.; Mottier, L.; Alvarez, L.; Solana, H.; Virkel, G. & Brophy, P.M. (2007). Understanding triclabendazole resistance. *Experimental and Molecular Pathology*, 82: 104-109.

Brito, M.Q.C.V. (1997). *Contribuição para o estudo nosoepidemiológico da fasciolose ovina na região do Douro-Sul*. Dissertação de Mestrado em Produção Animal. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.

Brown, W.C.; Davis, W.C.; Dobbelaere, D.E. & Rice-Ficht, A.C. (1994). CD4⁺ T-Cell clones obtained from cattle chronically infected with *Fasciola hepatica* and specific for adult worm antigen express both unrestricted and th2 cytokine profiles. *Infection and Immunity*, 62: 818-827.

C. Rapsch, C.; Schweizer, G.; Grimm, F.; Kohler, L.; Bauer, C.; Deplazes, P.; Braun, U. & Torgerson, P.R. (2006). Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *International Journal for Parasitology*, 36: 1153-1158.

- Cancela, M.; Acosta, D.; Rinaldi, G.; Silva, E.; Durán, R.; Roche, L.; Zaha, A.; Carmona, C. & Tort, J.F. (2008). A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*. *Biochimie*, 90: 1461-1475.
- Castro, E.; Freyre, A. & Hernández, Z. (2000). Serological responses of cattle after treatment and during natural re-infection with *Fasciola hepatica*, as measured with a dot-ELISA system. *Veterinary Parasitology*, 90: 201-208.
- Chambers, C.; Hoey, E.M.; Trudgett, A.; Fairweather, I. & Timson, D.J. (2010). Binding of serum albumin to the anthelmintic drugs albendazole, triclabendazole and their sulfoxides. *Veterinary Parasitology*, 171: 172-175.
- Charlier, J.; Duchateau, L.; Claerebout, E.; Williams, D. & Vercruysse, J. (2007). Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 78: 57-66.
- Charlier, J.; Meulemeester, L.; Claerebout, E.; Williams, D. & Vercruysse, J. (2008). Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. *Veterinary Parasitology*, 153: 44-51.
- Chauvin, A.; Moreau, E. & Boulard, C. (1997). Diagnosis of bovine fascioliasis using serology of pools of sera. Interpretation in field conditions. *Veterinary Research*, 28: 37-43.
- Chick, B.F.; Coverdale, O.R. & Jackson, A.R.B. (1980). Production effects of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in beef cattle. *Australian Veterinary Journal*, 56: 588-592.
- Clery, D.; Torgerson, P. & Mulcahy, G. (1996). Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 62: 71-82.
- Clery, D.G. & Mulcahy, G. (1998). Lymphocyte and cytokine responses of young cattle
- Coles, G.C.; Rhodes, A.C. & Stafford, K.A. (2000). Activity of closantel against adult triclabendazol-resistant *Fasciola hepatica*. *The Veterinary Record*, 146: 504.

Conceição, M.A.P. (2001). Fasciolose Bovina: Aspectos de diagnóstico e modelos de avaliação de risco. Novas abordagens. Dissertação de Doutoramento. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.

Conceição, M.A.P.; Durão, R.M.; Costa, I.H. & Correia da Costa, J.M. (2002). Evaluation of a Simple Sedimentation Method (modified McMaster) in Diagnostic of Bovine Fasciolosis. *Veterinary Parasitology*, 105: 337-343.

Cordero del Campillo, M. & Rojo-Vázquez, F.A. (1999). *Parasitología Veterinaria*. Madrid: McGraw-Hill.

Cornelissen, J.B.W.J.; Gaasenbeek, C.P.H.; Borgsteede, F.H.M.; Holland, W.G.; Harmsen, M.M. & Boersma, W.J.A. (2001). Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *International Journal of Parasitology*, 31: 728-737.

Corrêa, O. (1976). *Doenças Parasitárias Dos Animais Domésticos*. (3ª edição). Porto Alegre: Sulina.

Crossland, N.O. (1976). The effect of the molluscicide N-tritylmorpholine on transmission of *Fasciola hepatica*. *The Veterinary record*, 98: 45-48.

Cullen, J.M. & MacLachen, N. J. (2001). Liver, biliary system and exocrine pancreas. In M.D. McGavin, W.W. Carlton & J.F. Zachary. *Thompson's Special Veterinary Parasitology*, (3rd edition). USA: Mosby, Inc.

Cunha, F.O.V.; Marques, S.M.T. & Mattos, M.J.T. (2007). Prevalence of slaughter and liver condemnation due to *Fasciola hepatica* among sheep in the state of Rio Grande do Sul, Brazil 2000 and 2005. *Parasitologia Latinoamericana*, 62: 188-191.

Dalton, J.P. & Mulcahy, G. (2001). Parasite vaccines – a reality? *Veterinary Parasitology*, 98: 149-167.

Dalton, J.P.; McGonigle, S.; Rolph, T.P. & Andrews, S.J. (1996). Induction of protective immunity in cattle against infection with *fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infection and Immunity*, 64: 5066-5074.

- Daniel, R. & Mitchell, S. (2002). Fasciolosis in cattle and sheep. *The Veterinary Record*, 151: 219.
- De Bont, J; Claerebout, E.; Riveau, G.; Schacht, A.M.; Smets, K.; Conder, G.; Brake, D.A.; Capron, A. & Vercruysse, J. (2003). Failure of a recombinant *Schistosoma bovis*-derived glutathione S-transferase to protect cattle against experimental *Fasciola hepatica* infection. *Veterinary Parasitology*, 113: 135-144.
- Dixit, A.K.; Dixit, P. & Sharma, R.L. (2008). Immunodiagnostic/protective role of Cathepsin L cysteine proteinases secreted by *Fasciola species*. *Veterinary Parasitology*, 154: 177-184
- Donnelly, S.; O'Neill, S.M.; Sekiya, M.; Mulcahy, G. & Dalton, J.P. (2005). Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infection and Immunity*, 73: 166-173.
- Dorchies (2006). Flukes: Old Parasites But New Emergence. *In Proceedings for World Buiatrics Congress*. Nice, France: 322-336.
- Doyle, J.J. (1972). Evidence of an acquired resistance in calves to a single experimental infection with *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Science*, 13: 456-459.
- Dreyfuss, G.; Alarion, N.; Vignoles, P. & Rondelaud, D. (2006). A retrospective study on the metacercarial production of *Fasciola hepatica* from experimentally infected *Galba truncatula* in central France. *Parasitology Research*, 98: 162-166.
- Duménigo, B.E. & Mezo, M. (1999). Monoclonal antibody sandwich immunoassay detection of coproantigen to evaluate the efficacy of treatment in natural ovine fasciolosis. *Research in Veterinary Science*, 66: 165-167.
- during primary infection with *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Science*, 65: 169-171.
- Elitok, B.; Elitok, Ö.M. & Kabu, M. (2006). Field trial on comparative efficacy of four fasciolicides against natural liver fluke infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, 135: 279-285.

- Eslami, A.; Hosseini, S.H. & Meshgi, B. (2009). Animal fasciolosis in north of Iran. *Iranian Journal Public Heath*, 4: 132-135.
- Fairweather, I. & Boray, J.C. (1999). Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. *The Veterinary Journal*, 158: 81-112.
- Falcón, C.; Carranza, F.; Martínez, F.F.; Knubel, C.P.; Masih, D.T.; Motrán, C.C. & Cervi, L. (2010). Excretory-secretory products (ESP) from *Fasciola hepatica* induce tolerogenic properties in myeloid dendritic cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 137: 36-46
- Fidalgo, A.A.C. (2007). *Avaliação De Custos Directos Da Fasciolose Bovina No Concelho De Vagos*. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Flynn, R.J. & Mulcahy, G. (2008). Possible role for toll-like receptors in interaction of *Fasciola hepatica* excretory/secretory products with bovine macrophages. *Infection and Immunity*, 76: 678-684.
- Flynn, R.J.; Mannion, C.; Golden, O.; Hacariz, O & Mulcahy, G. (2007). Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. *Infection and Immunity*, 75: 1373-1381.
- Gaasenbeek, C.P.H.; Moll, L.; Cornelissen, J.B.W.J.; Vellema, P. & Borgsteede, F.H.M. (2001). An experimental study on triclabendazol resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 95: 37-43.
- Gajewska, A.; Smaga-Kozłowska, K. & Wiśniewski, M. (2005). Pathological changes of liver in infection of *Fasciola hepatica*. *Wiadomosci Parazytologiczne*, 51: 115-123.
- Genicot, B.; Mouligneau, F. & Lekeux, P. (1991). Economic and production consequences of liver fluke disease in double-muscled fattening cattle. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B*, 38: 203-208.
- Happich, F.A. & Boray, J.C. (1969). Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. 1. Comparative Studies on quantitative faecal examinations for chronic *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Australian Veterinary Journal*, 45: 326-328.

- Hendrix, C.M. (1998). *Diagnostic Veterinary Parasitology*. (2nd edition). USA: Mosby.
- Heppleston, P.B. (1972). Life history and population fluctuations of *Lymnaea truncatula* (Mull), the snail vector of fascioliasis. *Journal of Applied Ecology*, 9: 235-248.
- Heras, F.T. (1974). *Fasciolosis Hepatica De Los Ruminantes*. Leon: Sever-Cuesta.
- Hodasi, J.K.M. (1976). The effects of low temperature on *Lymnaea truncatula*. *Parasitology Research*, 48: 281-286.
- Hurtrez-Boussès, S.; Meunier, C.; Durand, P. & Renaud, F. (2001). Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes and Infection*, 3: 841-849.
- Hussein, A.A.; Hassan, I.M. & Khalifa, R.M.A. (2010). Development and hatching mechanism of *Fasciola* eggs, light and scanning electron microscopic studies. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17: 247-251.
- Hutchinson, G.W.; Dawson, K.; Fitzgibbon, C.C. & Martin, P.J. (2009). Efficacy of an injectable combination anthelmintic (nitroxynil + clorsulon + ivermectin) against early immature *Fasciola hepatica* compared to triclabendazole combination flukicides given orally or topically to cattle. *Veterinary Parasitology*, 162: 278-284.
- Isseroff, H.; Sawma, J.T. & Reino, D. (1977). Fascioliasis: role of proline in bile duct hyperplasia. *Science*, 198: 1157-1159.
- Jacquet, P. (2008). La fasciolose à *Fasciola hepatica*: physiopathologie, dépistage et prévention. *Le nouveau Practicien Vétérinaire*, 9/Août: 43-51.
- Jain, N.C. (1993). *Essentials of Veterinary Hematology*. USA: Lea & Febiger.
- Jones, T.C.; Hunt, R.D. & King, N. W. (1997). *Veterinary Pathology*, (6th edition). USA: Williams & Wilkins.
- Kassai, T. (1999). *Veterinary Helminthology*. Great Britain: Butterworth-Heinemann.

- Khaznadji, E.; Collins, P.; Dalton, J.P.; Bigot, Y. & Moire, N. (2005). A new multi-domain member of the cystatin superfamily expressed by *Fasciola hepatica*. *International Journal of Parasitology*, 35: 1115-25.
- Knubben-Schweizer, G.; Rüegg, S.; Torgerson, P.R.; Rapsch, C.; Grimm, F.; Hässig, M.; Deplazes, P. & Braun, U. (2009). Control of bovine fasciolosis in dairy cattle in Switzerland with emphasis on pasture management. *The Veterinary Journal*, in press.
- Leclipteux, T.; Torgerson, P.R.; Doherty, M.L.; McCole, D.; Protz, M.; Farnir, F. & Losson, B. (1998). Use of excretory/secretory antigens in a competition test to follow the kinetics of infection by *Fasciola hepatica* in cattle. *Veterinary Parasitology*, 77: 103-114.
- Lee, C.G.; Zimmerman, G.L. & Duimstra, J.R. (1992). Light and scanning electron microscopic studies of the extrahepatic bile duct of sheep with experimentally induced *Fasciola hepatica* infection. *American Journal of Veterinary Research*, 53: 796-800.
- López A. (2001). Respiratory System, Thoracic Cavity and Pleura. In M.D. McGavin, W.W. Carlton & J.F. Zachary. *Thompson's Special Veterinary Parasitology*, (3rd edition). USA: Mosby, Inc.
- Lotfollahzadeh, S.; Mohri, M.; Bahadori, S.R.; Dezfouly, M.R. & Tajik, P. (2008). The relationship between normocytic, hypochromic anaemia and iron concentration together with hepatic enzyme activities in cattle infected with *Fasciola hepatica*. *Journal of Helminthology*, 82: 85-88.
- Loyacano, A.F.; Skogerboe, T.L.; Williams, J.C.; DeReosa, A.A.; Gurie, J.A. & Shostrom, V.K. (2001). Effects of parenteral administration of doramectin or a combination of ivermectin and clorsulon on control of gastrointestinal nematode and liver fluke infections and growth performance in cattle. *Journal of the Veterinary American Medical Association*, 218: 1465-1468.
- Loyacano, A.F.; Williams, J.C.; Gurie, J. & DeRosa, A.A. (2002). Effect of gastrointestinal nematode and liver fluke infections on weight gain and reproductive performance of beef heifers. *Veterinary Parasitology*, 107: 227-234.

Mage, C.; Bourgne, H.; Toullieu, J.; Rondelaud, D. & Dreyfuss, G. (2002). *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Veterinary Research*, 33: 439-447.

Marques, S.T.; Scroferneker, M.L. & Edelweiss, M.I. (2005). Kidney pathology in cattle naturally infected by *Fasciola hepática*. *Israel Journal of Veterinay Medicine*, 60: 23-26.

Meek, A.H. & Morris, R.S. (1979). The longevity of *Fasciola hepatica* metacercariae encysted on herbage. *Australian Veterinary Journal*, 55: 58-60.

Mehlhorn, H. (Ed.) (2001). *Encyclopedia Reference of Parasitology. Biology, Stucture, Function*. (2nd edition). Germany: Springer.

Mekroud, A.; Chauvin, A. & Rondelaud, D. (2007). Variations of biological indicators as highly presumptive markers for fasciolosis in experimentally-infected sheep. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 158: 437-441.

Mezo, M.; González-Warleta M.; Carro, C. & Ubeira, F.M. (2004). Na ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). *Journal of Parasitology*, 90: 845-852.

Miller, C.M.D.; Smith, N.C.; Ikin, R.J.; Boulter, N.R.; Dalton, J.P. & Donnelly, S. (2009). Immunological Interactions between 2 Common Pathogens, Th1-Inducing Protozoan *Toxoplasma gondii* and the Th2-Inducing Helminth *Fasciola hepatica*. *PLoS ONE*, 4: e5692. doi:10.1371/journal.pone.0005692.

Miriam T.B.; O'Neill, S.M.; Dalton, J.P. & Mills, K.H.G. (1999). *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity*, 67: 5372-5378

Mitchell, G. (2002). Update on fasciolosis in cattle and sheep. *In Practice*, Julho/Agosto: 378-385.

Mohammed-Ali, N.A. & Bogan, J.A. (1987). The pharmacodynamics of the flukicidal salicylanilides, rafoxanide, closantel and oxcyclosanide. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10: 127-33.

Moll, L.; Gaasenbeek, C.P.H.; Vellema, P. & Borgsteede, F.H.M. (2000). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 91: 153-158.

Morrison, C.A.; T.; Colin, T.; Sexton, J.L.; Bowen, F.; Wickerl, J.; Friedel, T. & Spithill, T.W. (1996). Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine*, 14: 1603-1612.

Mulcahy, G. & Dalton, J.P. (2001). Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Research in Veterinary Science*, 70: 83-86.

Mulcahy, G.; O'Connor, F.; McGonigle, S.; Dowd, A.; Clery, D.G.; Andrews, S.J. & Dalton, J.P. (1997). Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine*, 16: 932-939.

O'Neill, S.M.; Brady, M.T.; Callanan, J.J.; Mulcahy, G.; Joyce, P.; Mills, K.H.G. & Dalton, J.P. (2000). *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunology*, 22: 147-155.

Ollerenshaw, C.B. (1959). The Ecology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *The Veterinary Record*, 71: 957-963.

Ollerenshaw, C.B. & Rowlands, W.T. (1959). A method of forecasting the incidence of fascioliasis in Anglesey. *The Veterinary Record*, 71, 591-598.

Ollerenshaw, C.B. (1971). Some observations on the epidemiology of fascioliasis in relation to the timing of molluscicide applications in the control of the disease. *The Veterinary Record*, 88: 152-164.

Ortiz, P.L.; Claxton, J.R.; Clarkson, M.J.; McGarryc, J. & Williams, D.J.L. (2000). The specificity of antibody responses in cattle naturally exposed to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 93: 121-134.

Owen, I.L. (1987). A field trial with triclabendazole for the control of fasciolosis. *Australian Veterinary Journal*, 64: 59-61.

Pritchard, G.C.; Forbes, A.B.; Williams, D.J.L.; Salimi-Bejestani, M.R. & Daniel, R.G. (2005). Emergence of fasciolosis in cattle in East Anglia. *The Veterinary Record*, 157: 578-582.

Radostitis, O.M.; Gay, C.C.; Hinchclitt, K.W. & Constable, P.D. (2007). *Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*, (10th edition). Spain: Elsevier.

Ramamoorthi Jayaraj, R.; Piedrafita, D.; Dynon, K.; Grams, R.; Spithill, T.W. & Smooker, P.M. (2009). Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Veterinary Parasitology*, 160: 230-236.

Rangel-Ruiz, L.J.; Marquez-Izquierdo, R. & Bravo-Nogueira, G. (1999). Bovine fasciolosis in Tabasco, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 81: 119-127.

Reichel, M.P. (2002). Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. *Veterinary Parasitology*, 107: 65-72.

Reichel, M.P.; Vanhoff, K. & Baxter, B. (2005). Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay performed in milk for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, 129: 61-66.

Roberts, J.A. & Suhardono. (1996). Approaches to the control of fasciolosis in ruminantes. *Internationa Journal of Parasitology*, 26: 971-981.

Rondelaud, D.; Dreyfuss, G. & Vignoles, P. (2006) Clinical and biological abnormalities in patients after fasciolosis treatment. *Médecine et maladies infectieuses*, 36: 466-468.

Rondelaud, D.; Vignoles, P.; Dreyfuss, G. & Mage, C. (2006). The control of *Galba truncatula* (Gastropoda: Lymnaeidae) by terrestrial snail *Zonitoides nitidus* on acid soils. *Biological Control*, 39: 290-299.

SAC VS (2007). Acute fasciolosis diagnosed in young Scottish calves. *The Veterinary Record*, 161: 249-252.

Salimi-Bejestani, M.R.; Cripps, P. & Williams, D.J.L. (2008). Evaluation of an ELISA to assess the intensity of *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Veterinary Record*, 162: 109-111.

Salimi-Bejestani, M.R.; Daniel, R.G.; Feldstead, S.M.; Cripps, P.J.; Mahmood, H. & Williams, D.J.L. (2005). Prevalence of *Fasciola hepatica* in dairy herds in England and Wales measured with an ELISA applied to bulk-tank milk. *The Veterinary Record*, 156: 729-731.

Salimi-Bejestani, M.R.; McGarry, J.W.; Felstead, S.; Ortiz, P.; Akca, A. & Williams, D.J.L. (2005). Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. *Research in Veterinary Science*, 78: 177-181.

Sangster, N.C. (2001). Managing parasiticide resistance. *Veterinary Parasitology*, 98: 89-109.

Schweizer, G.; Braun, U.; Deplazes, P. & Torgerson, P.R. (2005). Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *The Veterinary Record*, 157: 188-193.

Silva Leitão, J. (1965). *Parasitologia veterinária*. Lisboa: Editora Gráfica Portuguesa.

Şimşek, S.; Köroğlu, E.; Ütük, A.E. & Altay, K. (2006). Use of indirect excretory/secretory enzyme-linked immunosorbent assay (ES-ELISA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in eosinophilic and non-eosinophilic cattle from eastern Turkey. *Turkish Journal Veterinary Animal Science*, 30: 411-415.

Simsek, S.; Risvanli, A.; Utuk, A.E.; Yuksel, M.; Saat, N. & Koroglu, E. (2007). Evaluation of relationship between repeat breeding and *Fasciola hepatica* and hydatid cyst infections in cows in Elazig district of eastern Turkey. *Research in Veterinary Science*, 83: 102-104.

Sousa, C.A.F.B. (2001). *Contribuição para o Conhecimento do Risco Parasitário das Populações de Gamo (Dama dama L.) e Javali (Sus scrofa L.) da Tapada Nacional de Mafra*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agrónómica. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia – Universidade técnica de Lisboa.

Stalker, M.J. & Hayes, M.A. (2007). Liver and biliary system. In M.G. Maxie & K.V.F. Jubb (Eds.). *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of domestic Animals*, (5th edition). China: Elsevier Saunders.

Stevenson, C.R.; Mahoney, R.H.; Fisara, P.; Strehlau, G. & Reichel, M.P. (2002). The efficacy of formulations of triclabendazole and ivermectin in combination against liver fluke (*Fasciola hepatica*) and gastro-intestinal nematodes in cattle and sheep and sucking lice species in cattle. *Australian Veterinary Journal*, 80: 698-701.

Stitt, A.W.; Fairweather, I. & Mackender, R.O. (1994). The effect of triclabendazole ("Fasinex") on protein synthesis by the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *International Journal of Parasitology*, 4: 421-429.

Taira, N.; Yoshifuji, H. & Boray, J.C. (1997). Zoonotic Potential of infection with *Fasciola* spp. by consumption of freshly prepared raw liver containing immature flukes. *International Journal of Parasitology*, 27: 775-779.

Takagi, M.; Yamato, O.; Sasaki, Y.; Mukai, S.; Fushimi, Y.; Yoshida, T.; Mizukami, K.; Shoubudani, T.; Amimoto, K.; Chuma, T.; Shahada, F.; Endo, Y. & Deguchi, E. (2009). Successful treatment of hemoglobinuria in Japanese black cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71 (8): 1105-1108.

Tanimoto, T.; Shiota, K.; Ohtsuki, Y. & Araki, K. (1998). Eosinophilic proliferative pyelphebitis in the liver of Japanese beef cattle with fascioliasis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 60: 1073-1080.

Taylor, S.M. & Andrews, A.H. (1992). Endoparasites and Ectoparasites. In A.H. Andrews, R.W. Blowey; H. Boyd & R.G. Eddy (Eds.). *Bovine Medicine. Diseases and husbandry of cattle*. Great Britain: Blackwell

Thienpont, D.; Rochette, F. & Vanparijs, O.F.J. (1986). *Diagnostico de las helmintioses por medio del exame coprologico*. (2^a edición). Belgium: Janssen Research Foundation.

Thomas, I.; Coles, G.C. & Duffus, K. (2000). Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica* in south-west Wales. *The Veterinary Record*, 146: 200.

- Urquhart, G.M.; Armour, J.; Duncan, J.L. & Jennings, F.W. (1996). *Parasitologia Veterinária*. (2ª edição). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A.
- Vaessen, M.A.; Veling, J.; Frankena, K.; Graat, E.A. & Klunder, T. (1998). Risk factors for *Salmonella dublin* infection on dairy farms. *The Veterinary Quarterly*, 20: 97-99.
- Valero, M.A.; Darce, N.A.; Panova, M. & Mas-Coma, S. (2001). Relationships between host species and morphometric patterns in *Fasciola hepatica* adults and eggs from the northern Bolivian Altiplano hyperendemic region. *Veterinary Parasitology*, 102: 85-100.
- Valero, M.A.; Gironès, N.; García-Bodelón, M.A.; Periago, M.V.; Chico-Calero, I.; Khoubbane, M.; Fresno, M. & Mas-Coma, S. (2008). Anaemia in advanced chronic fasciolosis. *Acta Tropica*, 108: 35-43.
- Vignoles, P.; Aimeur, F.; Titi, A.; Rondelaud, D.; Mekroud, A. & Dreyfuss, G. (2010). Total cercarial output in two populations of *Galba truncatula* experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Journal of Helminthology*, 84: 77-80.
- Vignoles, P.; Alarion, N.; Bellet, V.; Dreyfuss, G. & Rondelaud, D. (2006). A 6- to 8-day periodicity in cercarial shedding occurred in some *Galba truncatula* experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, 98: 385-388.
- Vignoles, P.; Ménard, A.; Rondelaud, D.; Agoulon, A. & Dreyfuss, G. (2004). *Fasciola hepática*: the growth and larval productivity of redial generations in *Galba truncatula* subjected to miracidia differing in their mammalian origin. *Journal of Parasitology*, 90: 430-433.
- VLA (2010). Fasciolosis commonly diagnosed in cattle and sheep. *The Veterinary Record*, 166: 514.
- Walsh, K.P.; Brady, M.T.; Finlay, C.M.; Boon, L. & Mills, K.H.G. (2009). Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF- β - mediated suppression of Th17 and Th1 responses. *The Journal of Immunology*, 183: 1577-1586.
- Wilson, L.R.; Good, R.T.; Panaccio, M.; Wijffels, G.L.; Sandeman, R.M. & Spithill, T.W. (1998). *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B

protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Experimental Parasitology*, 88: 85–94.

Wilson, R.A. & Denison, J. (1980). The parasitic castration and gigantism of *Lymnaea truncatula* infected with the larval stages of *Fasciola hepatica*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 61: 109-119.

Wolf-Spengler, M.L. & Isseroff, H. (1983). Fascioliasis: bile duct collagen induced by proline from the worm. *Journal of Parasitology*, 69: 290-294.

Wyckoff, J.H. & Bradley, R.E. (1985). Diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in beef calves by plasma enzyme analysis. *American Journal of Veterinary Research*, 46: 1015-1986.

Yildirim, A.; Ica, A.; Duzlu, O. & Inci, A. (2007). Prevalence and risk factors associated with *Fasciola hepatica* in cattle from Kayseri province, Turkey. *Reveu Médecine Vétérinaire*, 158: 613-617.

Yilma, J.M. & Mesfin, A. (2000). Dry season bovine fasciolosis in Northwestern parto f Ethiopia. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 151: 493-500.

Zimmerman, G.L. (1996). Liver flukes in ruminants. In B.P. Smith. *Large Animal Internal Medicine*, (2nd edition). USA: Mosby.

Anexo 1

Método de sedimentação simples (McMaster)

- 1) Misturar 10g de fezes com água da torneira num tubo de ensaio e homogeneizar bem com uma vareta.
- 2) Filtrar a amostra através de um crivo de rede de cozinha para um copo cônico de 1000 mL, lavar rigorosamente e encher até à sua capacidade máxima.
- 3) Deixar a amostra repousar por 20 minutos, rejeitar o sobrenadante e re-suspender o sedimento com água da torneira. Repetir o processo 4 vezes.
- 4) Após a última sedimentação e decantação, recolher o sedimento para um tubo de ensaio e encher com água até perfazer um volume de 50 mL.
- 5) Agitar o tubo para re-suspender o sedimento. Com uma pipeta de Pasteur encher as duas câmaras da lâmina de McMaster.
- 6) O cálculo do número de ovos por grama de fezes (OPG) realiza-se da seguinte forma:

$$\text{OPG} = (\text{n}^\circ \text{ ovos contados} / \text{n}^\circ \text{ câmaras utilizadas}) \times (\text{Volume da solução de 1g fezes} / \text{Volume câmara})$$

(Conceição, Durão, Costa & Correia da Costa, 2002)

Anexo 2

Valores de Referência para Hemograma e Bíoquímica sanguíneos para bovinos

Hematócrito	24-46%
Hemoglobina	5-10 g/dL
Leucócitos	4-12 x 10 ³ /μL
Neutrófilos	0.6-4 x 10 ³ /μL
Linfócitos	2.5-7.5 x 10 ³ /μL
Monócitos	0.025-0.84 x 10 ³ /μL
Eosinófilos	0-2.4 x 10 ³ /μL
Basófilos	0-0.2 x 10 ³ /μL
Bilirrubina	0.01-0.47 mg/dL
Colesterol	80-120 mg/dL
Glucose	45-75 mg/dL
Proteínas Totais	6.7-7.5 g/dL
Albumina	3-3.6 g/dL
Racio A/G	0.8-0.9
Ureia	20-30 mg/dL
Creatinina	1-2 mg/dL
GGT	15-39UI/L
Ferro	57-162 μg/dL

Adaptado de Smith, 1996

Anexo 3

Resultados da pesquisa de anticorpos contra *Fasciola hepatica* de uma das explorações incluídas no estudo de prevalência em Odemira

Requisição	210034074	Data Entrada	14-05-2010	Data Ensaio	14-05-2010
		Data Emissão	17-05-2010	Fim Ensaio	17-05-2010
Cliente	MERIAL PORTUGUESA-SAUDE ANIMAL, LDA				
Técnico Responsável	RUI JORGE P. L. SILVA				
Proprietário	HERDEIROS AMERICO JESUS - ROGIL				
Morada - C.Postal	-				
Produto em análise	Soro			Data de Colheita 09-05-2010	
Lota/Re*				Hora Colheita	

Relatório de Ensaio
Produção Animal



Nº	Identificação amostra	Resultados	
		Fasciola hepática-Ac	Obs.
1	71	Pos	
2	28	Pos	
3	72	Pos	
4	27	Pos	
5	73	Pos	
6	32	Pos	
7	65	Pos	
8	33	Pos	
9	74	Pos	
10	28	Pos	
11	0813	Pos	